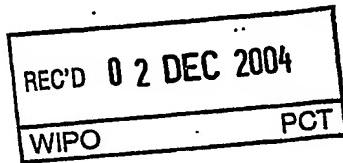


Europäisches  
PatentamtEuropean Patent  
OfficeOffice européen  
des brevets

28.11.2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

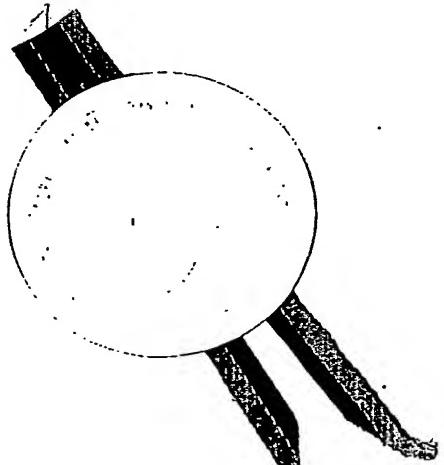
- 3 SEP 2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

M. de Jong-de Koster

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09109



**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 03/09109

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. BASF AKTIENGESELLSCHAFT - Ludwigshafen, Deutschland
3. BASF PLANT SCIENCE GMBH - Ludwigshafen, Deutschland

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Verfahren von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung  
Tagetes als Futtermittel

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Deutschland  
State: Deutschland  
Pays: Deutschland  
Tag: (13.11.2002)  
Date: 13. November 2002  
Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt: 10253112.9

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:  
Weitere Anmelder:

4. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
6. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
7. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
8. KLEBSATTEL, Nartin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
9. PFEIFFER, Angelika-Maria - Mannheim, Deutschland (nur US)
10. LUCK, Thomas - Neustadt, Deutschland (nur US)
11. VOESTE, Dirk - Schifferstadt, Deutschland (nur US)

**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	16. Dezember 2002 (16.12.2002)	10258971.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

**PCT-ANTRAG**

Original (für EINREICHUNG ) - gedruckt am 06.08.2003 01:54:59 PM

IV-1	<b>Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellschrift</b> Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als: IV-1-1 Name IV-1-2 Anschrift: . .	
IV-1-3	Telefonnr.	D-67056 Ludwigshafen Deutschland (0621) 60-94182
IV-1-4	Telefaxnr.	(0621) 60-52538
<b>V</b>	<b>Bestimmung von Staaten</b>	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	
AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM <b>ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</b> EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der <b>Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</b> EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der <b>Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</b> OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der <b>Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</b>		
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	
AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW		

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10

Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpzucht verwendet.

15

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

20

Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

25

WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtypflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.

30

Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhal-

35

ten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

Demgemäß wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden bevorzugt Pflanzen der Gattung Tagetes verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fett-säure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung Tagetes werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

Wildtyppflanzen der Gattung Tagetes weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäß gefunden, dass die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung Tagetes bei-spielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den gene-tisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes im Vergleich zum Wildtyp eine Ketola-se-Aktivität verursacht wird.

5

Unter Ketolase–Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität auf-weist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-

10 Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

15 Dementsprechend wird unter Ketolase–Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch 20 veränderte Ausgangspflanze der Gattung Tagetes verstanden.

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wild-type) der Gattung Tagetes oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung Tagetes oder beides verstanden werden.

25

Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin

30 jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze der Gattung Tagetes ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Soyalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt.
- 10 Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung Tagetes weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung Tagetes durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

- 20 In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung Tagetes.
- 25 Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- 30 Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung Tagetes nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

- 5 Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

- 10 Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

- 15 Alicaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

- 20 Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

- 25 Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

- 30 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

*Synechococcus* sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert),

- 5 Haematococcus pluvialis (Accession NO: AF534876, AAN03484; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 97, Protein : SEQ ID NO: 98),

Paracoccus sp. MBIC1143, (Accession NO: D58420, P54972; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 99, Protein : SEQ ID NO: 100),

- 10 *Brevundimonas aurantiaca* (Accession NO: AY166610, AAN86030; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 101, Protein : SEQ ID NO: 102,)

- 15 *Nodularia spumigena* NSOR10 (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 103, Protein : SEQ ID NO: 104) und

Deinococcus radiodurans R1(Accession NO: E75561, AE001872; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 105, Protein : SEQ ID NO: 106).

- 20 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase–Gene, die im erfindungsge- mäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschie- denen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäurese- quenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbe- sondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

- 25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase–Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Orga- nismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50\_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50\_C, bevorzugt bei 65\_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

10

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22\_C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65\_C angehoben werden.

15

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42\_C ausgeführt.

20

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

25

(i) 4X SSC bei 65\_C, oder

(ii) 6X SSC bei 45\_C, oder

30

(iii) 6X SSC bei 68\_C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68\_C, oder

35

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42\_C, oder

- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42\_C, oder
- 5 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42\_C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50\_C (moderate Bedingungen), oder
- 10 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42\_ (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- 15 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50\_C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65\_C, oder
- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68\_C, oder
- 20 (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42\_C, oder
- (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42\_C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65\_C (moderate Bedingungen).
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Planzen der Gattung Tagetes bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine
- 30 Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution,

- 5 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder

- 10 Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

- 15 Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

- Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

- 25 30 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

- 35 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

10 Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

15 Diagonals saved 5

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 20 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

25 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung Tagetes leicht ermitteln.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

35 In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann  
5 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in  
10 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

15 Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen  
20 Promotor in die Pflanze der Gattung Tagetes eingebracht.

Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden,  
25 *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 5 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.
- Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch
- 10 das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

- 25 Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

- Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

- 5 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.
- 10 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäß genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 15 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- 20 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.); Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

- 25 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen.
- 30 Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5 Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-  
protein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

10 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgen-  
den Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of caro-  
tenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der An-  
satz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenex-  
trakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stroma-  
protein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml  
Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium ge-  
löst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe  
20 von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionspro-  
dukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sand-  
mann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

25 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch ver-  
schiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regula-  
tionsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Ge-  
nexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäu-  
ren 30 kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase  
und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase  
gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispiels-  
weise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Akti-  
35

vatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

5

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung Tagetes eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

10

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

15

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

20

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

25

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNABindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

35

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase codiert, verwendet werden.

- 5 Bei genomischen Hydroxylase- bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 10 Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

- 15 sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

IembICAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108\_1, AF315289\_1, AF296158\_1, AAC49443.1, NP\_194300.1, NP\_200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276\_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ\_ERWHE, CRTZ\_PANAN, BAB79605.1, CRTZ\_ALCSP, CRTZ\_AGRAU, CAB56060.1, ZP\_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP\_745389.1, NP\_344225.1, NP\_849490.1, ZP\_00087019.1, NP\_503072.1, NP\_852012.1, NP\_115929.1, ZP\_00013255.1

- 25 Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Accession Y14809) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 107; Protein: SEQ ID NO. 108).

Beispiele für  $\beta$ -Cyclase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, codierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession

- 30 X86452).(Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20),.

Sowie  $\beta$ -Cyclasen der folgenden Accesion Nummern:

S66350 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - tomato

- 35 CAA60119 lycopene synthase [Capsicum annuum]

- S66349 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - common tobacco  
CAA57386 lycopene cyclase [Nicotiana tabacum]  
AAM21152 lycopene beta-cyclase [Citrus sinensis]  
AAD38049 lycopene cyclase [Citrus x paradisi]  
5 AAN86060 lycopene cyclase [Citrus unshiu]  
AAF44700 lycopene beta-cyclase [Citrus sinensis]  
AAK07430 lycopene beta-cyclase [Adonis palaestina]  
AAG10429 beta cyclase [Tagetes erecta]  
AAA81880 lycopene cyclase  
10 AAB53337 Lycopene beta cyclase  
AAL92175 beta-lycopene cyclase [Sandersonia aurantiaca]  
CAA67331 lycopene cyclase [Narcissus pseudonarcissus]  
● AAM45381 beta cyclase [Tagetes erecta]  
AAO18661 lycopene beta-cyclase [Zea mays]  
15 AAG21133 chromoplast-specific lycopene beta-cyclase [Lycopersicon esculentum]  
AAF18989 lycopene beta-cyclase [Daucus carota]  
ZP\_001140 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus str. MIT9313]  
ZP\_001050 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str.  
CCMP1378]  
20 ZP\_001046 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str.  
CCMP1378]  
ZP\_001134 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus str. MIT9313]  
ZP\_001150 hypothetical protein [Synechococcus sp. WH 8102]  
● AAF10377 lycopene cyclase [Deinococcus radiodurans]  
25 BAA29250 393aa long hypothetical protein [Pyrococcus horikoshii]  
BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]  
AAL01999 lycopene cyclase [Xanthobacter sp. Py2]  
ZP\_000190 hypothetical protein [Chloroflexus aurantiacus]  
ZP\_000941 hypothetical protein [Novosphingobium aromaticivorans]  
30 AAF78200 lycopene cyclase [Bradyrhizobium sp. ORS278]  
BAB79602 crtY [Pantoea agglomerans pv. milletiae]  
CAA64855 lycopene cyclase [Streptomyces griseus]  
AAA21262 dycopene cyclase [Pantoea agglomerans]  
C37802 crtY protein - Erwinia uredovora  
35 BAB79602 crtY [Pantoea agglomerans pv. milletiae]

- AAA64980 lycopene cyclase [Pantoea agglomerans]  
AAC44851 lycopene cyclase  
BAA09593 Lycopene cyclase [Paracoccus sp. MBIC1143]  
ZP\_000941 hypothetical protein [Novosphingobium aromaticivorans]  
5 CAB56061 lycopene beta-cyclase [Paracoccus marcusii]  
BAA20275 lycopene cyclase [Erythrobacter longus]  
ZP\_000570 hypothetical protein [Thermobifida fusca]  
ZP\_000190 hypothetical protein [Chloroflexus aurantiacus]  
AAK07430 lycopene beta-cyclase [Adonis palaestina]  
10 CAA67331 lycopene cyclase [Narcissus pseudonarcissus]  
AAB53337 Lycopene beta cyclase  
BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]

- Eine besonders bevorzugte  $\beta$ -Cyclase ist weiterhin die chromoplastenspezifische  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (AAG21133) (Nukleinsäure: SEQ ID No. 109; Protein: SEQ ID No. 110)

- In den erfindungsgemäß bevorzugten transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase–Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der

- 5 SeQ ID. NO: 18 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase–Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch

- 10 Hybridisierungs– und PCR–Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

- 15 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

- 25 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β-Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer β-Cyclase aufweisen.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase–Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID

5 NO: 20 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase–Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs– und PCR–

10 Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

15

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klo-

nierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der 5 Gattung Tagetes gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.

- 10 Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

- Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das 15 die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

- 20 Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

- 25 Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

- 30 Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestim-

mung der ε-Cyclase-Proteinmenge oder der ε-Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der ε-Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung  
5 einer ε-Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ε-Cyclase  
(d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ε-Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische  
Nachweisbarkeit der ε-Cyclase). Vorzugsweise wird die ε-Cyclase-Aktivität (bzw. die ε-  
Cyclase-Proteinmenge oder die ε-Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders  
bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt  
10 um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um  
100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen  
der ε-Cyclase-Aktivität (bzw. des ε-Cyclase-Proteins oder der ε-Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der ε-Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten  
15 Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden  
Bedingungen:

Die ε-Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res.  
Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge  
20 an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (ph 7.6), Lycopin als Substrat, Stro-  
maprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der ε-Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten  
Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach  
25 Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition;  
Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält  
50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM  
30 Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+,  
0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol  
mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach  
einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30C wird die Reaktion durch Zugabe von Chlo-  
roform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte wer-  
35 den mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the

- 5 lycopene isomerase/cyclase reaction in Narcissus pseudonarcissus L. chromopast.; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 10 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 15 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 20 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer K-suppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleis-  
35 tenden Expressionskassette

- f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen.
- 10 Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- 30 a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619;

WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

5 Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

10 Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissozierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

15 Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz  
25 identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

30 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz  
35 identisch ist.

Unter dem Begriff "ε-Cyclase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines ε-Cyclase-Gens verstanden, der neben der ε-Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

5

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ε-Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

10

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ε-Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorssequenz reichen können. Die optimale Länger der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

15

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

20

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ε-Cyclase-dsRNA Teile des ε-Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ε-Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

25

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ε-Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ε-Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

5

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

10 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

15

Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

20 Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

25 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

30

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

- 5 "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effiziente Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem
- 10 "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

- 15 Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.
- 20 25 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).
- 30 35 "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz,  
5 die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
  - b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.  
10 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst
- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und  
15 b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.  
20 Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden  
25 Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

30 SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

35 SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen.

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle

- 5 dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequen-  
zabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, se-  
paraten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkom-

- 10 plementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang  
und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats"  
miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur

- 15 umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz  
("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären  
dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz  
erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis  
umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-  
20 LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhal-  
ten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungs-  
signale.

- 25 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so um-  
fasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungs-  
signale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert  
eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreadinng").

- 30 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht  
werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 35 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressions-  
kassetten umfasst,

- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 5    c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

- Die dsRNA kann entweder *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.
- 20    In einer besonders bevorzugten Aufführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blüten-spezifischen Promoters, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promoters beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.
- 25    Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.
- 30    Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.
- 35    b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu vermindernde  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomicischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomicischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

- Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst.
- Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..
- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenpezifischen Promoters, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promoters beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.
- Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktus oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass

- 5 die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere  
10 Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelseitige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

- 15 c) Einbringen einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an  
20 spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche,  
25 RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

- 30 Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu verminderten  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur  
35 Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in

(EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in

- 5 Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden,  
10 die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 15 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechen-

- 20 den  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in  
25 US 5,034,323.

- 30 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38. Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation  
35 der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise

der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

- e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen  $\epsilon$ -Cyclase Gene, -  
5 RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endoge-

10 n Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Ver-  
minderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender  
Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier  
15 B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci  
USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627;  
Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and  
15 Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad  
Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA  
94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv  
Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA  
20 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387;  
Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  
25  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorre-  
gion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons  
oder Introns liegen.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber  
inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und  
30 Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Anti-  
körperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist  
beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et  
al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-  
272).

- f) Einbringen von den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen

- 5  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems  
(Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu verminderten  $\epsilon$ -Cyclase  
mittels viralen Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich  
10 mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J  
25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandakalshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998)  
Plant Cell 10(6):937-46).

- 15 Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz  
realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäure-  
sequenz kodierend für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß  
SEQ ID NO: 1 .

- 20 g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer  
Funktionsminderung an  $\epsilon$ -Cyclase-Genen

- Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen ge-  
zielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeu-  
gung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologer Rekombination z.B. durch  
Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und  
Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion  
oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder  
30 Nukleaseen (s.u.)

- Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch  
durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der  
erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Se-  
quenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekom-

- bination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten  $\epsilon$ -Cyclase selektiert.
- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384,

WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und  
WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

- Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeroplasty" bekannt sind (Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu verminderten Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.
- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:
- Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
  - Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

10 blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies

dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promoters oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines

15 blütenblattspezifischen Promoters erfolgt.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, die zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-

20 enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

25

Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

30 Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

- 5 Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.
- 10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wildtyps. Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase verstanden.
- 15

Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäß genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 20 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10% Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0.5 mM PMSF zugegeben.
- 25
- 30 Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kann nach veröffentlichten Beschreibungen gemessen werden (z.B. Schaller, Grausem, Benveniste, Chye, Tan, Song und Chua, Plant Physiol. 109 (1995), 761-770; Chappell, Wolf, Proulx, Cuellar und Saunders, Plant Physiol. 109 (1995) 1337-1343). Pflanzengewebe kann in kaltem Puffer (100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) homogenisiert und extrahiert werden. Das Homogenisat wird 15 Minuten lang bei 10.000g bei 4C zentrifugiert. Der Ü-
- 35

berstand wird danach bei 100.000g für 45-60 Minuten nochmals zentrifugiert. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird im Überstand und im Pellet der mikrosomalen

Fraktion (nach dem Resuspendieren in 100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0) und 50 mM DTT) bestimmt. Aliquots der Lösung und der Suspension (der Proteingehalt der Suspension entspricht etwa 1-10  $\mu$ g) werden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0

5 mit 3 mM NADPH und 20  $\mu$ M ( $^{14}$ C)HMG-CoA (58  $\mu$ Ci/ $\mu$ M) idealerweise in einem Volumen von 26  $\mu$ l für 15-60 Minuten bei 30C inkubiert. Die Reaktion wird terminiert

durch die Zugabe von 5  $\mu$ l Mevalonatlacton (1 mg/ml) und 6 N HCl. Nach Zugabe wird die Mischung bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Das in der Reaktion gebildete

10 ( $^{14}$ C)-Mevalonat wird quantifiziert, indem 125  $\mu$ l einer gesättigten Kaliumphosphat-

Lösung (pH 6.0) und 300  $\mu$ l Ethylacetat zugegeben werden. Die Mischung wird gut vermischt und zentrifugiert. Mittels Szintillationsmessung kann die Radioaktivität bestimmt werden.

- 15 Unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, auch IytB oder IspH bezeichnet, wird die Enzymaktivität einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase verstanden.

Unter einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase wird ein Protein  
20 verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat in Isopentenyldiphosphat und Dimethylallyldiphosphate umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Isopentenyldiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase die umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenyldiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens

- 5 600 % der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase –Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw.

- 10 Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.

Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren

- 15 Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF

- 20 zugegeben.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase–Aktivität kann über einen immunologischen Nachweis erbracht werden. Die Herstellung spezifischer Antikörper ist durch Rohdich und Kollegen (Rohdich, Hecht, Gärtner, A-

- 25 adam, Krieger, Amslinger, Arigoni, Bacher und Eisenreich: Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, Natl. Acad. Natl. Sci. USA 99 (2002), 1158-1163) beschrieben worden. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität beschreiben Altincicek und Kollegen (Altincicek, Duin, Reichenberg, Hedderich, Kollas, Hintz, Wagner, Wiesner, Beck und Jomaa: LytB protein catalyzes 30 the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis; FEBS Letters 532 (2002,) 437-440) ein in vitro-System, welches die Reduktion von (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphat in die Isopentenyl-diphosphat und Dimethylallyldiphosphat verfolgt.

Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase verstanden.

Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das

- 5 die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyethyl-ThPP und Glycerinaldehyd-3-  
Phosphat in 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Aktivität die in  
einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase um-

- 10 gesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. gebil-  
dete Menge -Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat verstanden.

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein

- 15 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase die umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. die gebildete Menge -Deoxy-D-Xylose-5-  
Phosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –

- 20 Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindes-  
tens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch  
bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 1-Deoxy-D-  
Xylose-5-Phosphat-Synthase–Aktivität des Wildtyps.

- 25 Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase–Aktivität in erfindungs-  
gemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen er-  
folgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff

- 30 homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.  
Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren  
Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten  
innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extrakti-  
onspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1  
35 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 %

Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Reaktionslösung (50-200 µl) für die Bestimmung der D-1-Deoxyxylulose-5-

- 5 Phosphat-Synthase-Aktivität (DXS) besteht aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 1 mM Thiamindiphosphat, 0,1% Tween-60, 1 mM Kaliumfluorid, 30 µM (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat (0.5 µCi), 0,6 mM DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat.

Der Pflanzenextrakt wird 1 bis 2 Stunden in der Reaktionslösung bei 37°C inkubiert.

- Danach wird die Reaktion durch Erhitzen auf 80°C für 3 Minuten gestoppt. Nach Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten wird der Überstand evaporiert, der Rest in 50 µl Methanol resuspendiert, auf eine TLC-Platte für Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel 60, Merck, Darmstadt) aufgetragen und in N-Propylalkohol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3; v/v/v) aufgetrennt. Dabei trennt sich radioaktiv markiertes D-1-deoxyxylulose-5-phosphat (oder D-1-deoxyxylulose) von (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat. Die Quantifizierung erfolgt mittels Scintillationszähler. Die Methode wurde beschrieben in Harker und Bramley (FEBS Letters 448 (1999) 115-119). Alternativ wurde ein fluorimetrischer Assay zur Bestimmung der DXS-Synthaseaktivität von Querol und Kollegen beschrieben (Analytical Biochemistry 296 (2001) 101-105).

- 20 Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase verstanden.

Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat in β-

- 25 Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase – Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. gebildete

- 30 Menge Isopenetenyldiphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase die umgesetzte Menge

1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-

- 5 Reduktoisomerase –Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität des Wildtyps.
- 10 Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase –Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff

- 15 homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) wird ge-

- 25 messen in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,3 mM NADPH und 0,3 mM 1-Deoxy-D-Xylulose-4-Phosphat, welches z.B. enzymatisch synthetisiert werden kann (Kuzuyama, Takahashi, Watanabe und Seto: Tetrahedron letters 39 (1998) 4509-4512). Die Reaktion wird durch Zugabe des Pflanzenextraktes gestartet. Das Reaktionsvolumen kann typischerweise 0,2 bis 0,5 mL betragen; die Inkubation 30 erfolgt bei 37C über 30-60 Minuten. Während dieser Zeit wird die Oxidation von NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Unter Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase verstanden.

Unter einer Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat in Dimethylallylphosphat umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Dimethylallylphosphat verstanden.
- 10 Bei einer erhöhten Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Dimethylallylphosphat erhöht.
- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase Aktivität des Wildtyps.
- 20 Die Bestimmung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität in erfindungsgemäß genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- 25 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- 30

Aktivitätsbestimmungen der Isopentenyl-Diphosphat-Isomerase (IPP-Isomerase) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Römer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc.

- 5 Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000), 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit  $0,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ Ci (1-}^{14}\text{C)IPP (Isopentenylpyrophosphat) (56 mCi/mmol, Amersham plc)}$  als Substrat in 0,4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliunfluorid in einem  
10 Volumen von etwa 150-500  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Extrakte werden mit Puffer gemischt (z.B. im Verhältnis 1:1) und für wenigstens 5 Stunden bei 28°C inkubiert. Danach wird etwa 200  $\mu\text{l}$  Methanol zugegeben und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (Endkonzentration 25 %) eine Säurehydrolyse für etwa 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Extraktion (jeweils 500  $\mu\text{l}$ ) mit Petrolether (versetzt  
15 mit 10% Diethylether). Die Radioaktivität in einem Aliquot der Hyperphase wird mittels Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität kann bei kurzer Inkubation von 5 Minuten bestimmt werden, da kurze Reaktionszeiten die Bildung von Reaktionsnebenprodukten unterdrückt (siehe Lützow und Beyer: The isopentenyl-diphosphate  $\Delta$ -isomerase and its relation to the phytoene synthase complex in daffodil chromoplasts;  
20 Biochim. Biophys. Acta 959 (1988), 118-126)

Unter Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

- 25 Unter einer Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat und Dimethylallylphosphat in Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

- 30 Dementsprechend wird unter Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Diphosphat verstanden.

- 35 Bei einer erhöhten Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Gera-

nyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Diphosphat erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase –Aktivität
- 5 mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Diphosphat-Synthase–Aktivität des Wildtyps.
- 10 Die Bestimmung der Geranyl-Diphosphat-Synthase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff
- 15 homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1
- 20 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- Die Aktivität der Geranyl-Diphosphat-Synthase (GPP-Synthase) kann in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2 % Tween-20, 5
- 25 μM (<sup>14</sup>C)IPP und 50 μM DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) nach Zugabe von Pflanzenextrakt bestimmt werden (nach Bouvier, Suire, d'Harlingue, Backhaus und Camara: Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, Plant Journal 24 (2000,) 241-252). Nach der Inkubation
- 30 von z.B. 2 Stunden bei 37C werden die Reaktionsprodukte dephosphoryliert (nach Koyama, Fuji und Ogura: Enzymatic hydrolysis of polyprenyl pyrophosphats, Methods Enzymol. 110 (1985), 153-155) und mittels Dünnschichtchromatographie und Messung der inkorporierten Radioaktivität analysiert (Dogbo, Bardat, Quennemet und Camara: Metabolism of plastid terpenoids: In vitro inhibition of phytoene synthesis by phenethyl
- 35 pyrophosphate derivatives, FEBS Letters 219 (1987) 211-215).

Unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

- Unter einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Diphosphate und Isopentenyl-Diphosphat in Farnesyl-Diphosphat umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat verstanden.

- Bei einer erhöhten Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

- Die Bestimmung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.
- Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der Franesylpyrophosphat-Synthase (FPP-Synthase) kann nach einer Vorschrift von Joly und Edwards (Journal of Biological Chemistry 268 (1993), 26983-26989) bestimmt werden. Danach wird die Enzymaktivität in einem Puffer aus 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, 20  $\mu$ M Geranylpyrophosphat und 5 40  $\mu$ M (1-<sup>14</sup>C) Isopentenylpyrophosphat (4 Ci/mmol) gemessen. Die Reaktionsmischung wird bei 37°C inkubiert; die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 N HCl (in 70 % Ethanol mit 19  $\mu$ g/ml Farnesol) gestoppt. Die Reaktionsprodukte werden somit durch Säurehydrolyse bei 37°C innerhalb von 30 Minuten hydrolysiert. Durch Zugabe von 10% NaOH wird die Mischung neutralisiert und mit Hexan ausgeschüttelt. Ein Aliquot der 10 Hexanphase kann zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen werden.

Alternativ können nach Inkubation von Pflanzenextrakt und radioaktiv markierten IPP die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel SE60, Merck) 15 in Benzol/Methanol (9:1) getrennt werden. Radioaktiv markierte Produkte werden eluiert und die Radioaktivität bestimmt (nach Gaffe, Bru, Causse, Vidal, Stamitti-Bert, Carde und Gallusci: LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development; Plant Physiology 123 (2000) 1351-1362).

20 Unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesyl-Diphosphat und Isopentenyl-Diphosphat in 25 Geranyl-Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete 30 Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat

und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase –
- 5 Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.
- 10 Die Bestimmung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase –Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff
- 15 homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1
- 20 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- Aktivitätsmessungen der Geranylgeranypyrophosphat-Synthase (GGPP-Synthase)
- 25 können nach der von Dogbo und Camara beschriebenen Methode (in Biochim. Biophys. Acta 920 (1987), 140-148: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Capsicum chromoplasts by affinity chromatography) bestimmt werden. Dazu wird einem Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Dithiothreitol, (1-<sup>14</sup>C)IPP (0,1  $\mu$ Ci, 10  $\mu$ M), 15  $\mu$ M
- 30 DMAPP, GPP oder FPP) mit einem Gesamtvolume von etwa 200  $\mu$ l Pflanzenextrakt zugesetzt. Die Inkubation kann für 1-2 Stunden (oder länger) bei 30°C erfolgen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol und 0,1 ml 6N HCl. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktionsmischung mit 6N NaOH neutralisiert, mit 1 ml Wasser vermischt und mit 4 ml Diethylether ausgeschüttelt. In einem Aliquot (z.B.
- 35 0,2 mL) der Etherphase wird mittels Szintillationszählung die Menge an Radioaktivität

bestimmt. Alternativ können nach Säurehydrolyse die radioaktiv markierten Prenylalcohole in Ether ausgeschüttelt werden und mit HPLC (25 cm-Säule Spherisorb ODS-1, 5 cm; Elution mit Methanol/Wasser (90:10; v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min) getrennt und mittels Radioaktivitätsmonitor quantifiziert werden (nach Wiedemann, Misawa und Sandmann: Purification and enzymatic characterization of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Erwinia uredovora* after expression in *Escherichia coli*;

- 5 5  
Unter Phytoen-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Synthase verstanden.

- 10 Unter einer Phytoen-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β-Ionon-Ring zu überführen.
- 15 Insbesondere wird unter einer Phytoen-Synthase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Diphosphat in Phytoen umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter Phytoen-Synthase –Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat 20 bzw. gebildete Menge Phytoen verstanden.

- Bei einer erhöhten Phytoen-Synthase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Phytoen erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Synthase–Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Synthase–Aktivität des Wildtyps.

- Die Bestimmung der Phytoen-Synthase–Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter 35 folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren

- 5 Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF
- 10 zugegeben.

- Aktivitätbestimmungen der Phytoenesynthase (PSY) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Romer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 15 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000) 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit (<sup>3</sup>H)Geranylgeranyl-pyrophosphat (15 mCi/mM, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis) als Substrat in 0,4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliunfluorid durchgeführt. Pflanzenextrakte werden mit Puffer gemischt, z B. 295 µl Puffer mit Extrakt in einem Gesamtvolumen von 500 µl. Inkubiert wird für wenigstens 5 Stunden bei 28C. Anschließend wird Phytoene durch zweimaliges Ausschütteln (jeweils 500 µl) mit Chloroform extrahiert. Das während der Reaktion gebildete radioaktiv markierte Phytoene wird mittels Dünn-schichtchromatographie auf Silicaplatten in Methanol/Wasser (95:5; v/v) getrennt. Phytoene kann in einer Jod-angereicherten Atmosphäre (durch Erhitzen weniger Iodkristalle) auf den Silicaplatten identifiziert werden. Ein Phytoene-Standard dient als Referenz. Die Menge an radioaktiv markiertem Produkt wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt. Alternativ kann Phytoene auch mittels HPLC, die mit einem Radioaktivitätsdetektor versehen ist, quantifiziert werden (Fraser, Albrecht und Sandmann: Development of high performance liquid chromatographic systems for the separation of radiolabeled carotenes and precursors formed in specific enzymatic reactions; J. Chromatogr. 645 (1993) 265-272).

Unter Phytoen-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Desaturase verstanden.

Unter einer Phytoen-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische

- 5 Aktivität aufweist, Phytoen in Phytofluen und/oder Phytofluen in  $\zeta$ -Carotin (Zetacarotin) umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phytoen-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phy-

- 10 toflen bzw. gebildete Menge Phytofluen bzw.  $\zeta$ -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten Phytoen-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase die umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. die gebildete Menge Phytofluen

- 15 bzw.  $\zeta$ -Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter min-

- 20 destens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Desaturase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Phytoen-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise un-

- 25 ter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert.

Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren

- 30 Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF

- 35 zugegeben.

Die Aktivität der Phytoendesaturase (PDS) kann durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem (<sup>14</sup>C)-Phytoen in ungesättigte Carotine gemessen werden (nach Römer, Fraser, Kiano, Shipton, Misawa, Schuch und Bramley: Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants; Nature Biotechnology 18 (2000) 666-669). Radio-

- 5 aktiv markiertes Phytoene kann synthetisiert werden nach Fraser (Fraser, De la Rivas, Mackenzie, Bramley: Phycomyces blakesleanus CarB mutants: their use in assays of phytoene desaturase; Phytochemistry 30 (1991), 3971-3976). Membranen von Plastiden des Zielgewebes können mit 100 mM MES-Puffer (pH 6,0) mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol in einem Gesamtvolumen von 1 mL inkubiert werden. In Aceton
- 10 gelöstes (<sup>14</sup>C)-Phytoen (etwa 100.000 Zerfälle/Minute für jeweils eine Inkubation) wird zugegeben, wobei die Acetonkonzentration 5 % (v/v) nicht übersteigen sollte. Diese Mischung wird bei 28C für etwa 6 bis 7 Stunden im Dunklen unter Schütteln inkubiert.
- Danach werden Pigmente dreimal mit etwa 5 mL Petrolether (mit 10 % Diethylether versetzt) extrahiert und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

- 15 Alternativ kann die Aktivität der Phytoenedesaturase nach Fraser et al. (Fraser, Misawa, Linden, Yamano, Kobayashi und Sandmann: Expression in Escherichia coli, purification, and reactivation of the recombinant Erwinia uredovora phytoene desaturase, Journal of Biological Chemistry 267 (1992), 19891-9895) gemessen werden.

- 20 Unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Zeta-Carotin-Desaturase verstanden.

- Unter einer Zeta-Carotin-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\zeta$ -Carotin in Neurosporin und/oder Neurosporin in Lycopin umzuwandeln.

- 25 Dementsprechend wird unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin verstanden.

- 30 Bei einer erhöhten Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase die umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. die gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Zeta-Carotin-Desaturase –
- 5 Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßigen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 10 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten
- 15 innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- 20 Analysen zur Bestimmung der ξ-Carotin-Desaturase (ZDS-Desaturase) können in 0,2 M Kaliumphosphat (pH 7,8, Puffervolumen von etwa 1 ml) durchgeführt werden. Die Anlysemethode dazu wurde von Breitenbach und Kollegen (Breitenbach, Kuntz, Takai-chi und Sandmann: Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type
- 25 ξ-carotene desaturase from Capsicum annuum; European Journal of Biochemistry. 265(1):376-383, 1999 Oct ) publiziert. Jeder Analyseansatz enthält 3 mg Phosphatidylcholin, das in 0,4 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) suspendiert ist, 5 µg ξ-Carotin oder Neurosporene, 0,02 % Butylhydroxytoluol, 10 µl Decyl-Plastochinon (1 mM methanolische Stammlösung) und Pflanzenextrakt. Das Volumen des Pflanzenextraktes muß der
- 30 Menge an vorhandener ZDS-Desaturase-Aktivität angepasst werden, um Quantifizierungen in einem linearen Messbereich zu ermöglichen. Inkubationen erfolgen typischerweise für etwa 17 Stunden bei kräftigem Schütteln (200 Umdrehungen/Minute) bei etwa 28°C im Dunklen. Carotinoide werden durch Zugabe von 4 ml Aceton bei 50°C für 10 Minuten unter Schütteln extrahiert. Aus dieser Mischung werden die Carotinoide in eine Petroletherphase (mit 10 % Diethylether) überführt. Die Dethy-
- 35

Iether/Petroletherphase wird unter Stickstoff evapiert, die Carotinoide wieder in 20  $\infty$  gelöst und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

Unter crtISO -Aktivität wird die Enzymaktivität eines crtISO-Proteins verstanden.

5

Unter einem crtISO-Proteins wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin in all-trans-Lycopin umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter crtISO-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das  
10 Protein b-Cyclase umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. gebildete Menge  
all-trans-Lycopin verstanden.

- Bei einer erhöhten crtISO-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich  
zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das crtISO-Proteins die umgesetzte Menge  
15 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. die gebildete Menge all-trans-Lycopin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der crtISO-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %,  
20 insbesondere mindestens 600 % der crtISO-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der crtISO-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25

- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten  
30 innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

35

Unter FtsZ-Aktivität wird die physiologische Aktivität eines FtsZ-Proteins verstanden.

Unter einem FtsZ-Protein wird ein Protein verstanden, das an der Zellteilungs und Plastidenteilungs fördernde Wirkung hat und Homologien zu Tubulinproteinen aufweist.

- 5 Unter MinD -Aktivität wird die physiologische Aktivität eines MinD -Proteins verstanden.

Unter einem MinD -Protein wird ein Protein verstanden, das eine multifunktionale Rolle bei der Zellteilung aufweist. Es ist eine Membran-assoziierte ATPase und kann innerhalb der Zelle eine oszillierende Bewegung von Pol zu Pol zeigen.

- 10 Weiterhin kann die Erhöhung der Aktivität von Enzymen des Nicht-Mevalonatweges zu einer weiteren Erhöhung des gewünschten Ketocarotenoid-Endproduktes führen. Beispiele hierfür sind die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthase, die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase und die 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphoshat-Synthase. Durch Änderungen der Genexpression der entsprechenden Gene kann die Aktivität der genannten Enzyme erhöht werden. Die veränderten Konzentrationen der relevanten Proteine können standardgemäß mittels Antikörpern und entsprechenden Blotting-techniken nachgewiesen werden. Die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Aktivität und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder crtISO-Aktivität und/oder FtsZ-Aktivität und/oder MinD-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Ge-

ranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp.

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Kopien des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder

MinD-Gens, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder ein crtISO-Protein und/oder FtsZ-Protein und/oder MinD-Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des Pflanzen eigenen crtISO-Proteins und/oder FtsZ-Proteins und/oder MinD-Proteins verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der entsprechenden Promotor DNA-Sequenz erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate

des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA-Sequenzen erfolgen.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer
- 5 Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder die Erhöhung der Ge-  
nexpression einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-  
Diphosphat-Reduktase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der  
Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-
- 10 Reduktoisomerase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure ko-  
dierend eine Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder die Erhöhung der Ge-  
nexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase  
und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Farne-  
syl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäu-  
re kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der  
Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder die  
Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase  
und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-  
Carotin-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
20 kodierend ein crtISO-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nuklein-  
säure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nuk-  
leinsäure kodierend ein MinD-Protein durch Einbringen von mindestens einer Nuklein-  
säure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindes-  
tens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-
- 25 Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend  
eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindes-  
tens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Redukto-  
isomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend  
eine Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase und/oder durch Einbringen von mindestens  
30 einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Ein-  
bringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-  
Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend  
eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens  
einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder durch Einbringen von  
35 mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder durch

Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure

- 5 re kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

Dazu kann prinzipiell jedes HMG-CoA-Reduktase-Gen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen bzw. Iso-

- 10 pentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Gen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Desaturase-Gen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Gen bzw. crtISO-Gen bzw. FtsZ-Gen bzw. MinD-Gen verwendet werden.

- 15 Bei genomischen HMG-CoA-Reduktase-Sequenzen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Sequenzen bzw. Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Sequenzen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Synthase-Sequenzen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Desaturase-Sequenzen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Sequenzen bzw. crtISO-Sequenzen bzw. FtsZ-Sequenzen bzw. MinD-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann,
- 20 25 die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nuklein-säuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

In den erfindungsgemäßenv bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser be-

vorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HMG-

- 30 CoA-Reduktase-Gen und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen und/oder Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Gen und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Desaturase-Gen und/oder

Zeta-Carotin-Desaturase-Gen und/oder crtISO-Gen und/oder FtsZ-Gen und/oder MinD-Gen vor.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze bei-
- 5 spielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-
- 10 Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-
- 15 5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-
- 20 Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder min-
- 25 destens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase oder
- 30 mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein crtISO-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein FtsZ-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein FtsZ-Protein und/oder mindestens eine exo-

gene Nukleinsäure, kodierend ein MinD-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein MinD-Protein auf.

Beispiele für HMG-CoA-Reduktase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*, Accession NM\_106299; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 111, Protein: SEQ ID NO: 112),

10 sowie weitere HMG-CoA-Reduktase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

P54961, P54870, P54868, P54869, O02734, P22791, P54873, P54871, P23228, P13704, P54872, Q01581, P17425, P54874, P54839, P14891, P34135, O64966, P29057, P48019, P48020, P12683, P43256, Q9XEL8, P34136, O64967, P29058,

15 P48022, Q41437, P12684, Q00583, Q9XHL5, Q41438, Q9YAS4, O76819, O28538, Q9Y7D2, P54960, O51628, P48021, Q03163, P00347, P14773, Q12577, Q59468, P04035, O24594, P09610, Q58116, O26662, Q01237, Q01559, Q12649, O74164, O59469, P51639, Q10283, O08424, P20715, P13703, P13702, Q96UG4, Q8SQZ9, O15888, Q9TUM4, P93514, Q39628, P93081, P93080, Q944T9, Q40148, Q84MM0,

20 Q84LS3, Q9Z9N4, Q9KLM0

Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene sind:

25

Eine Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana* (lytB/ISPH), ACCESSION AY168881, (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 113, Protein: SEQ ID NO:114),

30

sowie weitere (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

T04781, AF270978\_1, NP\_485028.1, NP\_442089.1, NP\_681832.1, ZP\_00110421.1, ZP\_00071594.1, ZP\_00114706.1, ISPH\_SYN3, ZP\_00114087.1, ZP\_00104269.1, AF398145\_1, AF398146\_1, AAD55762.1, AF514843\_1, NP\_622970.1, NP\_348471.1, NP\_562001.1, NP\_223698.1, NP\_781941.1, ZP\_00080042.1, NP\_859669.1, NP\_214191.1, ZP\_00086191.1, ISPH\_VIBCH, NP\_230334.1, NP\_742768.1, NP\_302306.1, ISPH\_MYCLE, NP\_602581.1, ZP\_00026966.1, NP\_520563.1,

NP\_253247.1, NP\_282047.1, ZP\_00038210.1, ZP\_00064913.1, CAA61555.1,  
ZP\_00125365.1, ISPH\_ACICA, EAA24703.1, ZP\_00013067.1, ZP\_00029164.1,  
NP\_790656.1, NP\_217899.1, NP\_641592.1, NP\_636532.1, NP\_719076.1,  
NP\_660497.1, NP\_422155.1, NP\_715446.1, ZP\_00090692.1, NP\_759496.1,  
5 ISPH\_BURPS, ZP\_00129657.1, NP\_215626.1, NP\_335584.1, ZP\_00135016.1,  
NP\_789585.1, NP\_787770.1, NP\_769647.1, ZP\_00043336.1, NP\_242248.1,  
ZP\_00008555.1, NP\_246603.1, ZP\_00030951.1, NP\_670994.1, NP\_404120.1,  
NP\_540376.1, NP\_733653.1, NP\_697503.1, NP\_840730.1, NP\_274828.1,  
NP\_796916.1, ZP\_00123390.1, NP\_824386.1, NP\_737689.1, ZP\_00021222.1,  
10 NP\_757521.1, NP\_390395.1, ZP\_00133322.1, CAD76178.1, NP\_600249.1,  
NP\_454660.1, NP\_712601.1, NP\_385018.1, NP\_751989.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene sind:

15 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aus *Lycopersicon esculentum*, ACCESSION #AF143812 (Nukleinsäure: SEQ ID NO:115 , Protein: SEQ ID NO: 116),

sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

AF143812\_1, DXS\_CAPAN, CAD22530.1, AF182286\_1, NP\_193291.1, T52289,  
AAC49368.1, AAP14353.1, D71420, DXS\_ORYSA, AF443590\_1, BAB02345.1,  
CAA09804.2, NP\_850620.1, CAD22155.2, AAM65798.1, NP\_566686.1, CAD22531.1,  
AAC33513.1, CAC08458.1, AAG10432.1, T08140, AAP14354.1, AF428463\_1,  
25 ZP\_00010537.1, NP\_769291.1, AAK59424.1, NP\_107784.1, NP\_697464.1,  
NP\_540415.1, NP\_196699.1, NP\_384986.1, ZP\_00096461.1, ZP\_00013656.1,  
NP\_353769.1, BAA83576.1, ZP\_00005919.1, ZP\_00006273.1, NP\_420871.1,  
AAM48660.1, DXS\_RHOCA, ZP\_00045608.1, ZP\_00031686.1, NP\_841218.1,  
ZP\_00022174.1, ZP\_00086851.1, NP\_742690.1, NP\_520342.1, ZP\_00082120.1,  
30 NP\_790545.1, ZP\_00125266.1, CAC17468.1, NP\_252733.1, ZP\_00092466.1,  
NP\_439591.1, NP\_414954.1, NP\_752465.1, NP\_622918.1, NP\_286162.1,  
NP\_836085.1, NP\_706308.1, ZP\_00081148.1, NP\_797065.1, NP\_213598.1,  
NP\_245469.1, ZP\_00075029.1, NP\_455016.1, NP\_230536.1, NP\_459417.1,  
NP\_274863.1, NP\_283402.1, NP\_759318.1, NP\_406652.1, DXS\_SYNLE,  
35 DXS\_SYNP7, NP\_440409.1, ZP\_00067331.1, ZP\_00122853.1, NP\_717142.1,

ZP\_00104889.1, NP\_243645.1, NP\_681412.1, DXS\_SYNEL, NP\_637787.1,  
DXS\_CHLTE, ZP\_00129863.1, NP\_661241.1, DXS\_XANCP, NP\_470738.1,  
NP\_484643.1, ZP\_00108360.1, NP\_833890.1, NP\_846629.1, NP\_658213.1,  
NP\_642879.1, ZP\_00039479.1, ZP\_00060584.1, ZP\_00041364.1, ZP\_00117779.1,

5 NP\_299528.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase  
10 aus Arabidopsis thaliana, ACCESSION #AF148852, (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 137 ,  
Protein: SEQ ID NO: 138),

sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene aus anderen  
Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

15 AF148852, AY084775, AY054682, AY050802, AY045634, AY081453, AY091405,  
AY098952, AJ242588, AB009053, AY202991, NP\_201085.1, T52570, AF331705\_1,  
BAB16915.1, AF367205\_1, AF250235\_1, CAC03581.1, CAD22156.1, AF182287\_1,  
DXR\_MENPI, ZP\_00071219.1, NP\_488391.1, ZP\_00111307.1, DXR\_SYNLE,  
20 AAP56260.1, NP\_681831.1, NP\_442113.1, ZP\_00115071.1, ZP\_00105106.1,  
ZP\_00113484.1, NP\_833540.1, NP\_657789.1, NP\_661031.1, DXR\_BACHD,  
NP\_833080.1, NP\_845693.1, NP\_562610.1, NP\_623020.1, NP\_810915.1,  
NP\_243287.1, ZP\_00118743.1, NP\_464842.1, NP\_470690.1, ZP\_00082201.1,  
NP\_781898.1, ZP\_00123667.1, NP\_348420.1, NP\_604221.1, ZP\_00053349.1,  
25 ZP\_00064941.1, NP\_246927.1, NP\_389537.1, ZP\_00102576.1, NP\_519531.1,  
AF124757\_19, DXR\_ZYMMO, NP\_713472.1, NP\_459225.1, NP\_454827.1,  
ZP\_00045738.1, NP\_743754.1, DXR\_PSEPK, ZP\_00130352.1, NP\_702530.1,  
NP\_841744.1, NP\_438967.1, AF514841\_1, NP\_706118.1, ZP\_00125845.1,  
NP\_404661.1, NP\_285867.1, NP\_240064.1, NP\_414715.1, ZP\_00094058.1,  
30 NP\_791365.1, ZP\_00012448.1, ZP\_00015132.1, ZP\_00091545.1, NP\_629822.1,  
NP\_771495.1, NP\_798691.1, NP\_231885.1, NP\_252340.1, ZP\_00022353.1,  
NP\_355549.1, NP\_420724.1, ZP\_00085169.1, EAA17616.1, NP\_273242.1,  
NP\_219574.1, NP\_387094.1, NP\_296721.1, ZP\_00004209.1, NP\_823739.1,  
NP\_282934.1, BAA77848.1, NP\_660577.1, NP\_760741.1, NP\_641750.1,

NP\_636741.1, NP\_829309.1, NP\_298338.1, NP\_444964.1, NP\_717246.1,  
NP\_224545.1, ZP\_00038451.1, DXR\_KITGR, NP\_778563.1.

Beispiele für Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase aus Adonis palaestina clone ApIPI28, (ipiAa1), ACCESSION #AF188060, veröffentlicht durch Cunningham,F.X. Jr. and Gantt,E.: Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in Escherichia coli, Plant Cell Physiol. 41 (1), 119-123 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 117, Protein: SEQ ID NO: 118),

10

sowie weitere Isopentenyl-Diphosphat-Δ-Isomerase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

15

Q38929, O48964, Q39472, Q13907, O35586, P58044, O42641, O35760, Q10132, P15496, Q9YB30, Q8YNH4, Q42553, O27997, P50740, O51627, O48965, Q8KFR5, Q39471, Q39664, Q9RVE2, Q01335, Q9HHE4, Q9BXS1, Q9KWF6, Q9CIF5, Q88WB6, Q92BX2, Q8Y7A5, Q8TT35, Q9KK75, Q8NN99, Q8XD58, Q8FE75, Q46822, Q9HP40, P72002, P26173, Q9Z5D3, Q8Z3X9, Q8ZM82, Q9X7Q6, O13504, Q9HFW8, Q8NJL9, Q9UUQ1, Q9NH02, Q9M6K9, Q9M6K5, Q9FXR6, O81691, Q9S7C4, Q8S3L8, Q9M592, Q9M6K3, Q9M6K7, Q9FV48, Q9LLB6, Q9AVJ1, Q9AVG8, Q9M6K6, Q9AVJ5, Q9M6K2, Q9AYS5, Q9M6K8, Q9AVG7, Q8S3L7, Q8W250, Q94IE1, Q9AVI8, Q9AYS6, Q9SAY0, Q9M6K4, Q8GVZ0, Q84RZ8, Q8KZ12, Q8KZ66, Q8FND7, Q88QC9, Q8BFZ6, BAC26382, CAD94476.

20

25

Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase aus Arabidopsis thaliana, ACCESSION #Y17376, Bouvier,F., Suire,C., d'Harlingue,A., Backhaus,R.A. and Camara,B.; Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpane synthesis in plant cells, Plant J. 24 (2), 241-252 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 119, Protein: SEQ ID NO: 120),

30

35 sowie weitere Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q9FT89, Q8LKJ2, Q9FSW8, Q8LKJ3, Q9SBR3, Q9SBR4, Q9FET8, Q8LKJ1,  
Q84LG1, Q9JK86

Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene sind:

5

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (FPS1), ACCESSION #U80605, veröffentlicht durch Cunillera,N., Arro,M., Delourme,D., Karst,F., Boronat,A. und Ferrer,A.: *Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes*, J. Biol. Chem. 271 (13),

10 7774-7780 (1996), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 121, Protein: SEQ ID NO:122),

sowie weitere Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

15 P53799, P37268, Q02769, Q09152, P49351, O24241, Q43315, P49352, O24242, P49350, P08836, P14324, P49349, P08524, O66952, Q08291, P54383, Q45220, P57537, Q8K9A0, P22939, P45204, O66126, P55539, Q9SWH9, Q9AVI7, Q9FRX2, Q9AYS7, Q94IE8, Q9FXR9, Q9ZWF6, Q9FXR8, Q9AR37, O50009, Q94IE9, Q8RVK7, Q8RVQ7, O04882, Q93RA8, Q93RB0, Q93RB4, Q93RB5, Q93RB3, Q93RB1,

20 Q93RB2, Q920E5.

Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

25 Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Sinaps alba*, ACCESSION #X98795, veröffentlicht durch Bonk,M., Hoffmann,B., Von Lintig,J., Schledz,M., Al-Babili,S., Hobeika,E., Kleinig,H. and Beyer,P.: *Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly*, Eur. J. Biochem. 247 (3), 942-950 (1997), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 123, Protein: SEQ ID NO:124),

30

sowie weitere Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

· P22873, P34802 ,P56966, P80042, Q42698, Q92236, O95749, Q9WTN0, Q50727,

35 P24322, P39464, Q9FXR3, Q9AYN2, Q9FXR2, Q9AVG6, Q9FRW4, Q9SXZ5, Q9AVJ7, Q9AYN1, Q9AVJ4, Q9FXR7, Q8LSC5, Q9AVJ6, Q8LSC4, Q9AVJ3,

Q9SSU0, Q9SXZ6, Q9SST9, Q9AVJ0, Q9AVI9, Q9FRW3, Q9FXR5, Q94IF0,  
Q9FRX1, Q9K567, Q93RA9, Q93QX8, CAD95619, EAA31459

Beispiele für Phytoen-Synthase -Gene sind:

5

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase aus *Erwinia uredovora*, ACCES-  
SION # D90087; veröffentlicht durch Misawa,N., Nakagawa,M., Kobayashi,K., Yama-  
no,S., Izawa,Y., Nakamura,K. und Harashima,K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora*  
carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in  
10 *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO:  
125, Protein: SEQ ID NO: 126),

sowie weitere Phytoen-Synthase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden  
Accession Nummern:

15

- CAB39693, BAC69364, AAF10440, CAA45350, BAA20384, AAM72615, BAC09112,  
CAA48922, P\_001091, CAB84588, AAF41518, CAA48155, AAD38051, AAF33237,  
AAG10427, AAA34187, BAB73532, CAC19567, AAM62787, CAA55391, AAB65697,  
AAM45379, CAC27383, AAA32836, AAK07735, BAA84763, P\_000205, AAB60314,  
20 P\_001163, P\_000718, AAB71428, AAA34153, AAK07734, CAA42969, CAD76176,  
CAA68575, P\_000130, P\_001142, CAA47625, CAA85775, BAC14416, CAA79957,  
BAC76563, P\_000242, P\_000551, AAL02001, AAK15621, CAB94795, AAA91951,  
P\_000448

25 Beispiele für Phytoen-Desaturase-Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase aus *Erwinia uredovora*, AC-  
CESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa,N., Nakagawa,M., Kobayashi,K.,  
Yamano,S., Izawa,Y., Nakamura,K. und Harashima,K.: Elucidation of the *Erwinia ure-  
dovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products ex-  
30 pressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure:  
SEQ ID NO: 127, Protein: SEQ ID NO: 128),

sowie weitere Phytoen-Desaturase –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden

35 Accession Nummern:

AAL15300, A39597, CAA42573, AAK51545, BAB08179, CAA48195, BAB82461,  
AAK92625, CAA55392, AAG10426, AAD02489, AAO24235, AAC12846, AAA99519,  
AAL38046, CAA60479, CAA75094, ZP\_001041, ZP\_001163, CAA39004, CAA44452,  
ZP\_001142, ZP\_000718, BAB82462, AAM45380, CAB56040, ZP\_001091, BAC09113,  
5 AAP79175, AAL80005, AAM72642, AAM72043, ZP\_000745, ZP\_001141, BAC07889,  
CAD55814, ZP\_001041, CAD27442, CAE00192, ZP\_001163, ZP\_000197, BAA18400,  
AAG10425, ZP\_001119, AAF13698, 2121278A, AAB35386, AAD02462, BAB68552,  
CAC85667, AAK51557, CAA12062, AAG51402, AAM63349, AAF85796, BAB74081,  
AAA91161, CAB56041, AAC48983, AAG14399, CAB65434, BAB73487, ZP\_001117,  
10 ZP\_000448, CAB39695, CAD76175, BAC69363, BAA17934, ZP\_000171, AAF65586,  
ZP\_000748, BAC07074, ZP\_001133, CAA64853, BAB74484, ZP\_001156, AAF23289,  
AAG28703, AAP09348, AAM71569, BAB69140, ZP\_000130, AAF41516, AAG18866,  
CAD95940, NP\_656310, AAG10645, ZP\_000276, ZP\_000192, ZP\_000186,  
AAM94364, EAA31371, ZP\_000612, BAC75676, AAF65582

15

Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase aus Narcissus pseudonarcissus, ACCESSION #AJ224683, veröffentlicht durch Al-Babili,S., Oelschlegel,J. and  
20 Beyer,P.: A cDNA encoding for beta carotene desaturase (Accession No.AJ224683) from Narcissus pseudonarcissus L.. (PGR98-103), Plant Physiol. 117, 719-719 (1998),  
(Nukleinsäure: SEQ ID NO: 129, Protein: SEQ ID NO: 130),

25 sowie weitere Zeta-Carotin-Desaturase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q9R6X4, Q38893, Q9SMJ3, Q9SE20, Q9ZTP4, O49901, P74306, Q9FV46, Q9RCT2,  
ZDS\_NARPS, BAB68552.1, CAC85667.1, AF372617\_1, ZDS\_TARER, CAD55814.1,  
CAD27442.1, 2121278A, ZDS\_CAPAN, ZDS\_LYCES, NP\_187138.1, AAM63349.1,  
30 ZDS\_ARATH, AAA91161.1, ZDS\_MAIZE, AAG14399.1, NP\_441720.1, NP\_486422.1,  
ZP\_00111920.1, CAB56041.1, ZP\_00074512.1, ZP\_00116357.1, NP\_681127.1,  
ZP\_00114185.1, ZP\_00104126.1, CAB65434.1, NP\_662300.1

Beispiele für crtISO-Gene sind:

35

Eine Nukleinsäure, kodierend eine crtISO aus Lycopersicon esculentum; ACCESSION #AF416727, veröffentlicht durch Isaacson,T., Ronen,G., Zamir,D. and Hirschberg,J.:

Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants; Plant Cell 14 (2), 333-342 (2002),

- 5 (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 131, Protein: SEQ ID NO:132),

sowie weitere crtISO –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- 10 AAM53952

Beispiele für FtsZ-Gene sind:

● Eine Nukleinsäure, kodierend eine FtsZ aus Tagetes erecta, ACCESSION #AF251346,

- 15 veröffentlicht durch Moehs,C.P., Tian,L., Osteryoung,K.W. and Dellapenna,D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development  
Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 133, Protein:  
SEQ ID NO: 134),

- 20 sowie weitere FtsZ –Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

CAB89286.1, AF205858\_1, NP\_200339.1, CAB89287.1, CAB41987.1, AAA82068.1,  
T06774, AF383876\_1, BAC57986.1, CAD22047.1, BAB91150.1, ZP\_00072546.1,

- 25 NP\_440816.1, T51092, NP\_683172.1, BAA85116.1, NP\_487898.1, JC4289,  
BAA82871.1, NP\_781763.1, BAC57987.1, ZP\_00111461.1, T51088, NP\_190843.1,

● ZP\_00060035.1, NP\_846285.1, AAL07180.1, NP\_243424.1, NP\_833626.1,  
AAN04561.1, AAN04557.1, CAD22048.1, T51089, NP\_692394.1, NP\_623237.1,  
NP\_565839.1, T51090, CAA07676.1, NP\_113397.1, T51087, CAC44257.1, E84778,

- 30 ZP\_00105267.1, BAA82091.1, ZP\_00112790.1, BAA96782.1, NP\_348319.1,  
NP\_471472.1, ZP\_00115870.1, NP\_465556.1, NP\_389412.1, BAA82090.1,

NP\_562681.1, AAM22891.1, NP\_371710.1, NP\_764416.1, CAB95028.1,  
FTSZ\_STRGR, AF120117\_1, NP\_827300.1, JE0282, NP\_626341.1, AAC45639.1,  
NP\_785689.1, NP\_336679.1, NP\_738660.1, ZP\_00057764.1, AAC32265.1,

- 35 NP\_814733.1, FTSZ\_MYCKA, NP\_216666.1, CAA75616.1, NP\_301700.1,  
NP\_601357.1, ZP\_00046269.1, CAA70158.1, ZP\_00037834.1, NP\_268026.1,

FTSZ\_ENTHR, NP\_787643.1, NP\_346105.1, AAC32264.1, JC5548, AAC95440.1,  
NP\_710793.1, NP\_687509.1, NP\_269594.1, AAC32266.1, NP\_720988.1,  
NP\_657875.1, ZP\_00094865.1, ZP\_00080499.1, ZP\_00043589.1, JC7087,  
NP\_660559.1, AAC46069.1, AF179611\_14, AAC44223.1, NP\_404201.1.

5

Beispiele für MinD -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine MinD aus Tagetes erecta, ACCESSION #AF251019, veröffentlicht durch Moehs,C.P., Tian,L., Osteryoung,K.W. und Dellapenna,D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development; Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 135, Protein: SEQ ID NO: 136),

sowie weitere MinD –Gene mit den folgenden Accession Nummern:

15

NP\_197790.1, BAA90628.1, NP\_038435.1, NP\_045875.1, AAN33031.1,  
NP\_050910.1, CAB53105.1, NP\_050687.1, NP\_682807.1, NP\_487496.1,  
ZP\_00111708.1, ZP\_00071109.1, NP\_442592.1, NP\_603083.1, NP\_782631.1,  
ZP\_00097367.1, ZP\_00104319.1, NP\_294476.1, NP\_622555.1, NP\_563054.1,

20 NP\_347881.1, ZP\_00113908.1, NP\_834154.1, NP\_658480.1, ZP\_00059858.1,  
NP\_470915.1, NP\_243893.1, NP\_465069.1, ZP\_00116155.1, NP\_390677.1,  
NP\_692970.1, NP\_298610.1, NP\_207129.1, ZP\_00038874.1, NP\_778791.1,  
NP\_223033.1, NP\_641561.1, NP\_636499.1, ZP\_00088714.1, NP\_213595.1,  
NP\_743889.1, NP\_231594.1, ZP\_00085067.1, NP\_797252.1, ZP\_00136593.1,

25 NP\_251934.1, NP\_405629.1, NP\_759144.1, ZP\_00102939.1, NP\_793645.1,  
NP\_699517.1, NP\_460771.1, NP\_860754.1, NP\_456322.1, NP\_718163.1,  
NP\_229666.1, NP\_357356.1, NP\_541904.1, NP\_287414.1, NP\_660660.1,  
ZP\_00128273.1, NP\_103411.1, NP\_785789.1, NP\_715361.1, AF149810\_1,  
NP\_841854.1, NP\_437893.1, ZP\_00022726.1, EAA24844.1, ZP\_00029547.1,

30 NP\_521484.1, NP\_240148.1, NP\_770852.1, AF345908\_2, NP\_777923.1,  
ZP\_00048879.1, NP\_579340.1, NP\_143455.1, NP\_126254.1, NP\_142573.1,  
NP\_613505.1, NP\_127112.1, NP\_712786.1, NP\_578214.1, NP\_069530.1,  
NP\_247526.1, AAA85593.1, NP\_212403.1, NP\_782258.1, ZP\_00058694.1,  
NP\_247137.1, NP\_219149.1, NP\_276946.1, NP\_614522.1, ZP\_00019288.1,

35 CAD78330.1

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als HMG-CoA-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität

- 5 von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

- 10 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 112 leicht auffinden.

- 15 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 111 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise  
20 leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HMG-CoA-Reduktase der Sequenz  
25 SEQ ID NO: 112.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.  
35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von 5 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114, und die die enzymatische Eigenschaft einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat- 10 Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie 15 vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 114 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und 20 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 113 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden. 25

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 114. 30

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand 35

von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, ent-

- 5 haltend die Sequenz SEQ ID NO: 113 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von dieser Se-

- 10 quenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Se-  
quenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevor-  
zugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten min-  
destens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 116, und die die  
enzymatische Eigenschaft einer (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aufweisen.

- 15 Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-  
Xylose-5-Phosphat-Synthase–Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen  
Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben,  
durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rück-  
20 übersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 116 leicht  
auffinden.

- Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-  
Xylose-5-Phosphat-Synthase–Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend  
25 von der Sequenz SEQ ID NO: 115 aus verschiedenen Organismen deren genomische  
Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs– und  
PCR–Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (1-  
30 Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen einge-  
bracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (1-Deoxy-D-  
Xylose-5-Phosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 116.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der  
35 Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform
- 10 als 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 138 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 138, und die die enzymatische Eigenschaft einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase aufweisen.

- Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-
- 20 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase–Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 138 leicht auffinden.

25

- Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase–Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 137 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs– und PCR–Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase der Sequenz SEQ ID NO: 138.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 137 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Isopentenyl-D-Isomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 118, und die die enzymatische Eigenschaft einer Isopentenyl-D-Isomerase aufweisen.

- Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 118 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 117 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Isopentenyl-D-Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Isopentenyl-D-Isomerase der Sequenz SEQ ID NO: 118.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 120 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 119 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 120.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122, und die die enzymatische Eigenschaft einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

- Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 122 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 121 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Farnesyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 122.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

- Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 124 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 123 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen einge-

bracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 124.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der  
5 Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen  
10 leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 in den Organismus ein.

- 15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %,  
20 noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Synthase aufweisen.

- Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich  
25 beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 126 leicht auffinden.
- 30 Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 125 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 126.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 128 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 128, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Desaturase aufweisen.

25

● Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 128 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 127 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 128.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 127 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Zeta-Carotin-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 130 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 130, und die die enzymatische Eigenschaft einer Zeta-Carotin-Desaturase aufweisen.

25

● Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 130 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 129 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Zeta-Carotin-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 130.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 129 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als CrtIso-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 132 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 132, und die die enzymatische Eigenschaft einer CrtIso aufweisen.

25

● Weitere Beispiele für CrtIson und CrtIso-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 132 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für CrtIson und CrtIso-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 131 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der CrtIso-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CrtIso der Sequenz SEQ ID NO: 132.

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand

- 10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 131 in den Organismus ein.

- 15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als FtsZ-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 134 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 134, und die die enzymatische Eigenschaft einer FtsZ aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SeQ ID NO: 134 leicht auffinden.

- 30 Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 133 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der FtsZ-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der FtsZ der Sequenz SEQ ID NO: 134

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand

- 10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 133 in den Organismus ein.

- 15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als MinD-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 136 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens  
20 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 136, und die die enzymatische Eigenschaft einer MinD aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für MinDn und MinD–Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 136 leicht auffinden.
- 30 Weitere Beispiele für MinDn und MinD–Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 135 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs– und PCR–Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der MinD-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MinD der Sequenz SEQ ID NO: 136.

- 5 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand

- 10 von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

● In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 135 in den Organismus ein.

- 15 Alle vorstehend erwähnten HMG-CoA-Reduktase-Gene, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Phytoen-Synthase-Gene, Phytoen-Desaturase-Gene, Zeta-Carotin-Desaturase-Gene, crtISO-Gene, FtsZ-Gene oder MinD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

● In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf.

Unter einer reduzierten Aktivität wird, wie vorstehend erwähnt, vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines Enzyms in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe,

- 5 Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung einer Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Aktivität direkt

- 10 bestimmt werden oder über die Bestimmung der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Proteins (d.h. fehlende

- 15 Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des entsprechenden Proteins).

Unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase –Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeneigenen  $\beta$ -Hydroxylase verstanden.

- 20 Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzeneigene Hxdroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise Tagetes erecta die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase die  $\beta$ -Hydroxylase von Tagetes erecta verstanden.

- 25 Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzeneigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

- 30 Dementsprechend wird unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase –Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

- Bei einer reduzierten endogenen  $\beta$ -Hydroxylase–Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endo-

gene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

- Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die mehrheitlich Carotinoide des  $\alpha$ -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer heterologen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide des  $\beta$ -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene  $\beta$ -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 107, Protein: SEQ ID No. 108).

- Die Bestimmung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität erfolgt wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität.

- Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:
- Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.

Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,

- Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-

antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene β-Hydroxylase-antisenseRNA gegen ein endogenes β-Hydroxylase-Gen (also 5 genomische DNA-Sequenzen) oder ein endogenes β-Hydroxylase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α-anomere Nukleinsäuresequenzen,

- 10 c) Einbringen mindestens einer endogenen β-Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 15 d) Einbringen mindestens einer endogenen β-Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene β-Hydroxylase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 20 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes β-Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 f) Einbringen mindestens einer, den endogenen β-Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem endogenen β-Hydroxylase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen β-Hydroxylase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes endogenes β-Hydroxylase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen endogene β-Hydroxylase-Gensequenzen generiert werden.

35 Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer endogenen β-Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder

Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder

- 5 Aktivität einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, des Transports der Zeaxanthin-Epoxidase und/oder endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationelongation oder -termination umfassen.
- 10

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- 15 a) Einbringen einer doppelsträngigen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA wurde vorstehend für  
20 die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ausführlich beschrieben. Analog lässt sich dieses Verfahren für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität durchführen.

- Unter einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz  
25 oder auch endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder  
30 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

5

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-

10 Promotor-Sequenz identisch ist.

Unter dem Begriff „endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript“ wird der transkribierte Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequen-

15 zen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endoge-20 nen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, iden-tisch ist.

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz werden Teilse-25 quenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequen-z des Transkripts bzw. der Promotorssequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höch-s-30 tens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindes-tens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA Teile des endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Transkripts

- 5 und/oder Teilsequenzen der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil des Pflanze eigenen endoge-

- 10 nen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet,

selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken.

- 20 Ferner betrifft die Erfindung ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA) umfassend dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-  
25 endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Transkriptes, und

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

- 30 Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA transkriptiert wird.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkriptierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz,  
5 die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-  
endogene  $\beta$ -Hydroxylase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im we-  
sentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

10 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

● In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Nuklein-  
15 säuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß  
SEQ ID NO: 139 oder ein Teil derselben verstanden.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletio-  
nen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase  
20 Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression  
bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80  
%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwi-  
schen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des  
"sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, bzw. zwischen dem  
25 "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-  
Gens.

● Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem endogenen  
 $\beta$ -Hydroxylase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Ver-  
30 minderung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Expression zu bewirken. Demzufolge be-  
steht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen,  
wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergen-  
zen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend  
von der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Sequenz des einen Organismus generiert wurde,  
35 die endogene  $\beta$ -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrü-

cken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

- 5     Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).
- 10    "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.
- 15

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA

- 20    a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- 25    b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.
- Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst
- 30    a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- 35    b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Zur Herstellung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

- 5 SEQ ID NO: 141: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  
endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

SEQ ID NO: 142: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  
endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

- 10 Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

- 15 Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats"  
20 miteinander verbunden.

- Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären  
25 dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).
- 30 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungs-signale.
- Weitere bevorzugte Ausführungsformen für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -  
35 Hydroxylase Aktivität ergeben sich analog der vorstehend beschriebenen, bevorzugten

Ausführungsformen der Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität unter Austausch der  $\epsilon$ -Cyclase durch endogene  $\beta$ -Hydroxylase.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte

- 5 Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

15

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

25

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

30

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

● 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

25 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

● 30 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

● 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

● 25 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

30 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

35 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-

Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-

- 5 Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine

- 10 erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine

- 15 erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf-

- 20 weisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausge-

- 25 wählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine

- 35 reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Ak-

tivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Far-

- 5 nesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verur-

- 10 sachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-
- Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-
- Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-

- 15  $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-
- Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-

- 25 Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

- 30 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte e-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,

- 5 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte e-Cyclase-Aktivität, eine erhöhte b-Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene b-Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-

- 15 Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

- 25 Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

- 30 die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren ein-bringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

- die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-  
5 ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110 aufweist

und die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von  
10 Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  
15  $\varepsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder  
20 eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-  
25 ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 100 aufweist,

30 die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist, und die reduzierte  $\varepsilon$ -Cyclase-

Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gemäß den vorstehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen verursacht wird.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes kann, wie 5 nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit 10 erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und/oder der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-15 Reduktoisomerase-Aktivität und/oder der Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität und/oder der Granyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder der crtISO-Aktivität 20 und/oder der FtsZ-Aktivität und/oder der MinD-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase bzw. Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren 25 kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-30 Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtIso-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die 35 Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bzw. der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität kann

analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz bzw. unter Verwendung von anti-endogenen b-Hydroxylase-Nukleinsäuresequenzen oder endogenen b-Hydroxylase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenzen anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase  
5 erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die  
10 vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.  
15

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die  
20 die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette  
25 stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart,  
30 das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung Tagetes und Verfahren zur Her-  
35

stellung von transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Galile et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

10 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

● "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

● 25 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der 35 Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hille-

brand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor ent-

- 5 halten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor 10 (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

- 15 Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder 20 der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-

Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J

- 25 Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and 30 Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfassst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498),

- 35 des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al.

(1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß 10 entwicklungsabhängig erfolgt.

10

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise

15

Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

20

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

25

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

30

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 1).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

35

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

- Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promoters mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase–Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase–Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der Ncol Schnittstelle:

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTC

5 GTTCTGTCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-  
CACTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCGCG-  
TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCGGC-  
GATTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAAGTGAAGACTGCGG-  
GATCC\_BamHI

10

pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTC

GTTCTGTCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-  
15 CACTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCGCG-  
TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCGGC-  
GATTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAAGTGAAGACTGCGCTG-  
GATCC\_BamHI

20 pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTC

GTTCTGTCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-

CACTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCGCG-

25 TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCGGC-  
GATTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAAGTGAAGACTGCGGG-  
GATCC\_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabisopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (*rbcS*) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

35 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-

Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit

- 5 Kodons, die von Pflanzen der Gattung Tagetes bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente

- 10 manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adapto-
- ren oder Linker angesetzt werden.

- 15 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger  
20 als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche  
25 sind gegeneinander beliebig austauschbar.

● Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequen-  
30 ce. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

- 35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt wer-

den. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

- 5 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

- 15 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

5

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10

15

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

20

Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung Tagetes mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

25

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

30

35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes weisen

- 5 im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Ver-

- 10 abreitung an Tiere.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder

Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von asta-

xanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung

- 15 von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzentei-

len werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extrakt-

20 tion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem ge-

eigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und

verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das

Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die

astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzube-

reiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern,

- 25 wobei die Reihenfolge beliebig ist.

Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gege-  
benenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungs-  
mittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid,

- 30 Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder  
Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann  
aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch  
eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

- 35 Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auf-  
trennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Asta-

xanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder

- 5 Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farnton.

- 10 Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatidae.

Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.

- 15 Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.

Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.

- 20 Bevorzugter Anatidae ist Flamingo.

Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten

- 25 oder Gänse verstanden.

Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale

- 30 Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.

- 35 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von asta-

xanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht.

- Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung
- 5 Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfutterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- 10 Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.
- Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.
- 15 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.
- 20 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.
- Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beigemischt werden.
- 25 Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.
- 30 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl

oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in  
5 flüssiger oder pulverisierter Form vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte  
astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert  
oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen bei-  
10 gemischt werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhalti-  
ge Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Ex-  
trakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

15 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen  
durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gat-  
tung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen  
oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.

20 Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass  
die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die  
astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der  
Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozes-  
25 siert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fisch-  
futterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine,  
Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe  
30 und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden  
Komponenten zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Gew.-%</b>	<b>Einwaage f. 500 kg</b>
		<b>kg</b>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Gew.-%</b>
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

5

In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

- 10 Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter bei-

spielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den

- 5 Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung,
- 10 Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.

Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die soge-

- 15 nannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflan-

- 20 zen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.

Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder

- 25 Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.

- 30 Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile,

- 35 insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Beson-

ders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

- Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen  
5 oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

- Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte  
10 vorteilhaft.

- Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

- 15 Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

- 20 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulvige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginat, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

- 25 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

- 30 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

- Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthin-

haltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

- In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

10 können.

Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner eine Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 20 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 25 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
- 30 Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel I

- 5 Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 10 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

- 15 Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen 20 der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

- Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l 25 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg 30 der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60\_C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

5

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem

15 enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
53\_C 2 Minuten  
72\_C 3 Minuten  
1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz 35 codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Ampli-

fikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

- Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine  
5 Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von  
der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in  
einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit  
die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbil-  
dung 1 und 2, Sequenzvergleiche).
- 10 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Gueri-  
neau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch  
Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI  
geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in  
15 der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transi-  
peptid enthält, heißt pJKETO2.

Beispiel I.2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em.

- 20 Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit ei-  
nem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus  
*Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Al-  
25 genkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus plu-  
vialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

- 30 Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm  
192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polyme-  
rase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines  
35 sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen  
Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem

5 enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 10 - 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

15  
1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
53\_C 2 Minuten  
72\_C 3 Minuten  
20 1X 72\_C 1 0 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

25  
Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24  
30 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmente aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-

Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO3.

Beispiel I.3:

- 5 Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.
- 10 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).
- 15

Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20
- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
  - 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

- Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz,  
25 in dem enthalten war:

- 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 30 - 2U Klenow Enzym

- Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.  
35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
20	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS

- 5 *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel I.4:

- 10 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp.* PCC 7120 codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

- 15 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

25 Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

- Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 30 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von

100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert.

Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal

- 5 wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

- 10 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels “polymerase chain reaction” (PCR) aus *Nostoc PCC 7120* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

- 15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 ul einer *Nostoc PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs

- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)

- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)

- 25 - 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)

- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)

- 25.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 30 1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

55°C 1 Minuten

72°C 3 Minuten

- 35 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G er-

5 halten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten 10 *Nostoc PCC 7120*.

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pjIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragments aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pjIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pjNOST.

20 Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte 25 unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

30 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-Xhol Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert 35 (Abbildung 3, Konstrukt-karte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse

(204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungs-signal von CaMV.

5 Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte  
10 mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).  
Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blüten-  
spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion  
9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15 Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thalia-*  
*na* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Stan-  
dardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO:  
33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) be-  
inhaltet, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25 - 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)  
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)  
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)  
30 - 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35 1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute

50_C	1 Minute
72_C	1 Minute
1X 72_C	10 Minuten

- 5 Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

- 15 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 al Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

- 35 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
50\_C 1 Minute  
5 72\_C 1 Minute  
1X 72\_C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem 10 Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 15 - 0.5 mg A7/9 Amplifikat  
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, 20 in dem enthalten war:

- 17.6 ml gA7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 25 - 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
  - 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
  - 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 5 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10 1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
50\_C 1 Minute  
72\_C 1 Minute  
1X 72\_C 10 Minuten

15 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

30 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

35 Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen

Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

- Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktakarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungs-signal von CaMV

- Beispiel I.5.B:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomicischer DNA aus *A.thaliana*  
- 0.25 mM dNTPs

- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
  - 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)
  - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
  - 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 5 - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten  
10 35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

15 Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von 20 Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

30 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 5 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-Xhol Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 10

Beispiel I.5C:

- Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp.*  
15 PCC 7120 Ketolase in *Tagetes erecta*.

- Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transit-peptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expressi-  
on erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen  
20 Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill  
et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

- Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thalia-na* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Stan-  
25 dardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID  
No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) be-  
inhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:  
  
- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*  
- 0.25 mM dNTPs  
35 - 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)  
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)

- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
10 72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

15 Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

25 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 ul Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
  - 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
  - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 15 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte 20 Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 0.5 ug A1/4 Amplifikat
- 0.25 ug A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 17.6 ul A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 uM dNTPs
- 2 ul 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

- 5 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 ul Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM AP3-1(SEQ ID No. 93)  
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)  
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 15 - 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

- 25 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.
- 30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJI-TAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp

- 5 SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PNOST.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter 10 der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PNOST wurde das 2.6 KB bp SacI-Xhol (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20 Beispiel I.6:  
Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die 25 Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28 °C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21 °C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer 30 zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter 35 Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reporter-

- gene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.
- 10 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 15 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 20 mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als 25 zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.
- 30 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.
- 35

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- 5
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 10
- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 15
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 20
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

- 25
- Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.
  - Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

30

**Beispiel I.8**  
Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel I.8.1  
35 Trennung von Carotinoideestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

## Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml).

- 5 Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester),

- 10 rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

- Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das  
15 Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

## Beispiel 1.9

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

- 25 Allgemeine Arbeitsvorschrift

- Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0.75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterin-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas* spec.). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37C. Nach Zugabe 35 0.35 g Na<sub>2</sub>S0<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert

(3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na<sub>2</sub>S0<sub>4</sub>×10H<sub>2</sub>O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

5 Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten spezifischen Expression von Epsilon-cyclase  
10 dsRNAs in *Tagetes erecta*

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blüten spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971:  
15 Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des  
20 ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethode aus  
25 *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ml genomicscher DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 35

- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
10	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
	1X 72_C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 ml Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

35

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)

- 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
  - 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
  - 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 5 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10 1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
50\_C 2 Minuten  
72\_C 3 Minuten  
1X 72\_C 10 Minuten

- 15 Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind.  
20 Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9
- 25 - 0.25 mg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 50 mM dNTPs  
- 2 ml 1X Klenow Puffer  
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

- 5 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)  
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)  
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 15 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
50\_C 1 Minuten  
72\_C 1 Minuten  
1X 72\_C 10 Minuten

- 25 Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 30 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der

den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR  
5 unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Genet 220: 245-50)sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 15 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 20 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
25 35X 94\_C 1 Minute  
53\_C 1 Minuten  
72\_C 1 Minuten  
1X 72\_C 10 Minuten

30 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

35 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3' Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heißtt pJA11 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5' Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abge-

kühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

5 Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)  
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 15 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)  
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)  
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)  
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)  
- 28.8 ml Aq. Dest.

30 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
35	58_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten

1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38 ) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heißt pJCI3.

5

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-Xhol Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkafe).

● 15 In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon- cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-Xhol Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkafe).

25

● In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

30

Beispiel I.12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

35

Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)

- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

5 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
35X 94\_C 1 Minute  
58\_C 1 Minuten  
10 72\_C 1 Minuten  
1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte 15 in einem 396 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten 20 jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

25 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4. Durch die Ligierung entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 30 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region 35 der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI5. Durch die

Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-  
Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

- Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-  
5 mation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte  
unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung  
des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-Xhol Fragment aus pJAI5 mit  
dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstrukt-karte).
- 10 In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771  
bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in  
sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Frag-  
ment 3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense  
Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
15

#### Beispiel I.13

##### Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

- Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wur-  
20 de durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al.  
Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8:  
457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes*  
*erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.
- 25 Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 ug genomische DNA in einem 25 ul Reaktions-  
ansatz mit EcoRV und Rsal verdaut, anschließend auf 300 ml verdünnt und über Nacht  
bei 16\_C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64)  
und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt,  
30 das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Ac-  
cession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des  
5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 11).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94\_C 2 Minuten
- 35X 94\_C 1 Minute
- 53\_C 1 Minute
- 72\_C 1 Minute
- 1X 72\_C 10 Minuten

20 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 11).

25 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

30 Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35 - 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.2 mM jedes dNTPs
  - 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
  - 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 5 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt
- 10 - AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.
- 15 Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- 1X 93\_C: 1 Minute, 95\_C: 1 Minute
  - 5X 94\_C: 30 Sekunden, 62\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 15 1X 94\_C: 30 Sekunden, 25\_C: 3 Minuten, ramp to 72\_C in 3 Minuten,  
72\_C: 2.5 Minuten
- 15X 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 20 1X 72\_C: 5 Minuten
- Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 25 - 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- - 0.8 mM dNTP
  - 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
  - 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 30 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt
- 35 Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- 12X 94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;

94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten

1X 72\_C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.8 mM dNTP

10

- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt

15

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94\_C: 15 Sekunden, 29\_C: 30 Sekunden, 72\_C: 2 Minuten

1X 72\_C: 5 Minuten

20

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 12).

25

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

30

Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

**Beispiel I.14**

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

5

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501).

10

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

15

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel I.13 ) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

20

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
  - 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 30
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 28.8 uml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
  - 5 - 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
  - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 28.8 ml Aq. Dest.
- 10 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| ●  | 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94_C | 1 Minute   |
|    |     | 53_C | 1 Minuten  |
| 15 |     | 72_C | 1 Minuten  |
|    | 1X  | 72_C | 10 Minuten |
- Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 20 361 Bp-Fragment.
- Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. 25 Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.
- 30 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.
- 35

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch 5 die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Anti-sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer 10 DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält 20 heisst cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense 25 Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-Xhol Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den Xhol geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst 35 cs46.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

- 5 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-Xhol Fragment aus cs44 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstrukt-karte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in anti-sense Orientierung.
- 10

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-Xhol Fragment aus cs45 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstrukt-karte).
- 15

- In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.
- 20

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CAI7 wurde das 3219bp SacI-Xhol Fragment aus cs46 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstrukt-karte)

- 25 In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das 30 Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

#### Beispiel I.15

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

- 35 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die

Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28\_C / 20 bis 200 mE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21\_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer  
5 zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5AI3  
10 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28\_C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei  
15 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timenitin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient.

zient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium um bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von AgNO<sub>3</sub> (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5AI3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

## Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in  
 5 flüssigem Stickstoff gemörser und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifi-  
 10 ziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizier-ten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend be-  
 15 schriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Verände-  
 rungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch  
 20 veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

25 Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

**Beispiel II**

Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend

- 5 werden die getrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

**Beispiel III**

- 10 Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von *Tagetes erecta*, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Ace-

- 15 ton, Hexan, Methylenechlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgesmisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lö-  
20 sungsmittel/ Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunklen und in der Kühle) evapo-  
riert.

- 25 Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunklen und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen.  
30 Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötl-  
ich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

**Beispiel IV**

Herstellung von extrudiertem Forellenvfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes

5

Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

<b>Komponenten</b>	<b>(%)</b>	<b>Einwaage f. 500 kg Kg</b>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

10 Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

15 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprührt (Applikation durch PPA-Methode).

20 Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

## Beispiel V

Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter – Prüfung der Bioverfügbarkeit.

Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg

10 Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.

15 • Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.

20 • Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.

- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.

25 • Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu verhindern. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.

- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

30

Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdiäten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch ölfgeoated wird.

- Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.

- 5     • Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.
- Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

10 Untersucht wird der Einfluß der erfundungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmaszezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

- 15 Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmaszezuwachs.

20 Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

25 Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtons repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge auf.

30 Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

35 Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden

bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

## Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.  
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.  
15
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.  
20
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.  
25
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.  
30

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
- 5 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatidae.
- 10 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei-dotter.
- 15 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 20 12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- 30 14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.  
5
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.  
10
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.  
15
18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.  
20
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.  
25
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.  
30

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatidae.
- 5 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 10 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.
- 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 15 25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
- 20 26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 25 28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 30 29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten  
10 sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

KETO2.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTGGACCAGCTTACCGGAACCGCTGAGGCACACTCAAGGAGAACGGAGGAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C  
 X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTGGACCAGCTTACCGGAACCGCTGAGGCACACTCAAGGAGAACGGAGGAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C  
 KETO2.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTCCGTCAAGAGGAGTCAGACGCCGCCGCCGCCGACTGAAGAAATGCCATAAGCCACCCACCTCCGACACAAGGG 20C  
 X86782.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTCCGTCAAGAAGAGTCAGACGCCGCCGCCGCCGACTGAAGAAATGCCATAAGCCACCCACCTCCGACACAAGGG 20C  
 KETO2.seq CATCACAAATGGCGCTAGCTGTCACTGGCTCCCTGGCGCAGTGTCCTCCACGCCATTTCAAATCAAGCTCCGACCTCTGGACAGCTGCACTGG 30C  
 X86782.seq CATCACAAATGGCGCTACGCTGTCACTGGCTCCCTGGCGCAGTGTCCTCCACGCCATTTCAAATCAAGCTCCGACCTCTGGACAGCTGCACTGG 30C  
 KETO2.seq CTGCCCCGTGTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGGGGACCCAGCAGCTGTCACATGTCCTGAGTATTCCTGCTGGAGTTCTGTACACAGGC 40C  
 X86782.seq CTGCCCCGTGTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGGGGACCCAGCAGCTGTCACATGTCCTGAGTATTCCTGCTGGAGTTCTGTACACAGGC 40C  
 KETO2.seq TTTTTATCACCAACCCATGATGCTATGCCATGGCACCATGCCATGAGAAACAGGCAGGTTAATGACTCTTGGGAGAGTATGCACTCCCTGTACGCCCTG 50C  
 X86782.seq TTTTTATCACCAACCCATGATGCTATGCCATGGCACCATGCCATGAGAAACAGGCAGGTTAATGACTCTTGGGAGAGTATGCACTCCCTGTACGCCCTG 50C  
 KETO2.seq GTTTGATTACAACATGCTGACCGCAAGCATGGGAGCACCACAAACCCACACTGGCGAGGTGGCAAGGGACCCCTGACTTCCACAGGGAAACCCCTGGCAAT 60C  
 X86782.seq GTTTGATTACAACATGCTGACCGCAAGCATGGGAGCACCACAAACCCACACTGGCGAGGTGGCAAGGGACCCCTGACTTCCACAGGGAAACCCCTGGCAAT 60C  
 KETO2.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCAGCTACATGTCGATGTGGCAGTTGGCGGCCCTCGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGGCCCAA 70C  
 X86782.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCAGCTACATGTCGATGTGGCAGTTGGCGGCCCTCGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGGCCCAA 70C  
 KETO2.seq TGCGGAACCTGGTGGTTCATGGGGCCCGGCCCATCCTGTCGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCACGTACATGGCCCACAGCCTGAGCCCTGGGCC 80C  
 X86782.seq TGCGGAACCTGGTGGTTCATGGGGCCCGGCCCATCCTGTCGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCACGTACATGGCCCACAGCCTGAGCCCTGGGCC 80C  
 KETO2.seq CGCGTCAGGCCTTCACCAACGGCTCATGAACCTGGTGGAAAGTCGGCACTAGGCAGGGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTCGACCTG 90C  
 X86782.seq CGCGTCAGGCCTTCACCAACGGCTCATGAACCTGGTGGAAAGTCGGCACTAGGCAGGGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTCGACCTG 90C  
 KETO2.seq CACTGGGACCAACCCCTGGCCCTTGGCCCCCTGGTGGAGCTGCCAACCTGGCCCTGCTGGGGAGGTCTGGTCCCTGCCATGCCCCCCTGCTGGTCCCTGCCATG 99C  
 X86782.seq CACTGGGACCAACCCCTGGCCCTTGGCCCCCTGGTGGAGCTGCCAACCTGGCCCTGCTGGTCCCTGCCATGCCCCCCTGCTGGTCCCTGCCATG 99C

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
X86782.pro	M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
KETO2.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W	100
X86782.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W	100
KETO2.pro	L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
X86782.pro	L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
KETO2.pro	R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
X86782.pro	R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
KETO2.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
X86782.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
KETO2.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
X86782.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
KETO2.pro	H W E H H R W P P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A	329
X86782.pro	H W E H H R W P P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A	329

Abbildung 3:

Konstrukt zur Überexpression des Ketolase  
(b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit  
rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des  
d35S-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt)

5

10

15

20

25

30

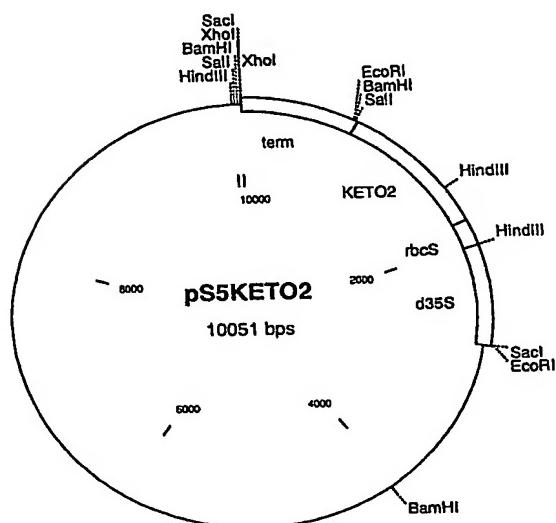


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt).

5

10

15

20

25

30

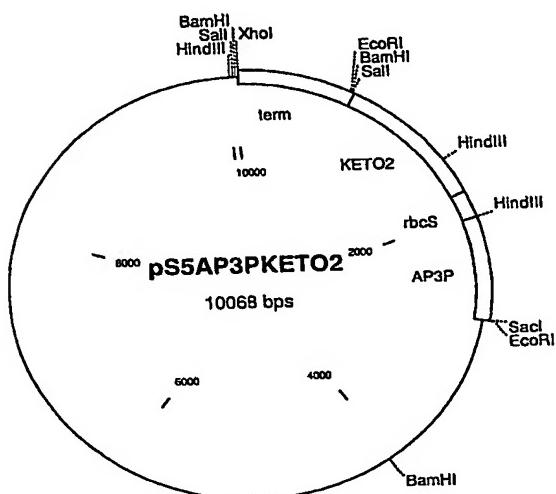


Abbildung 5

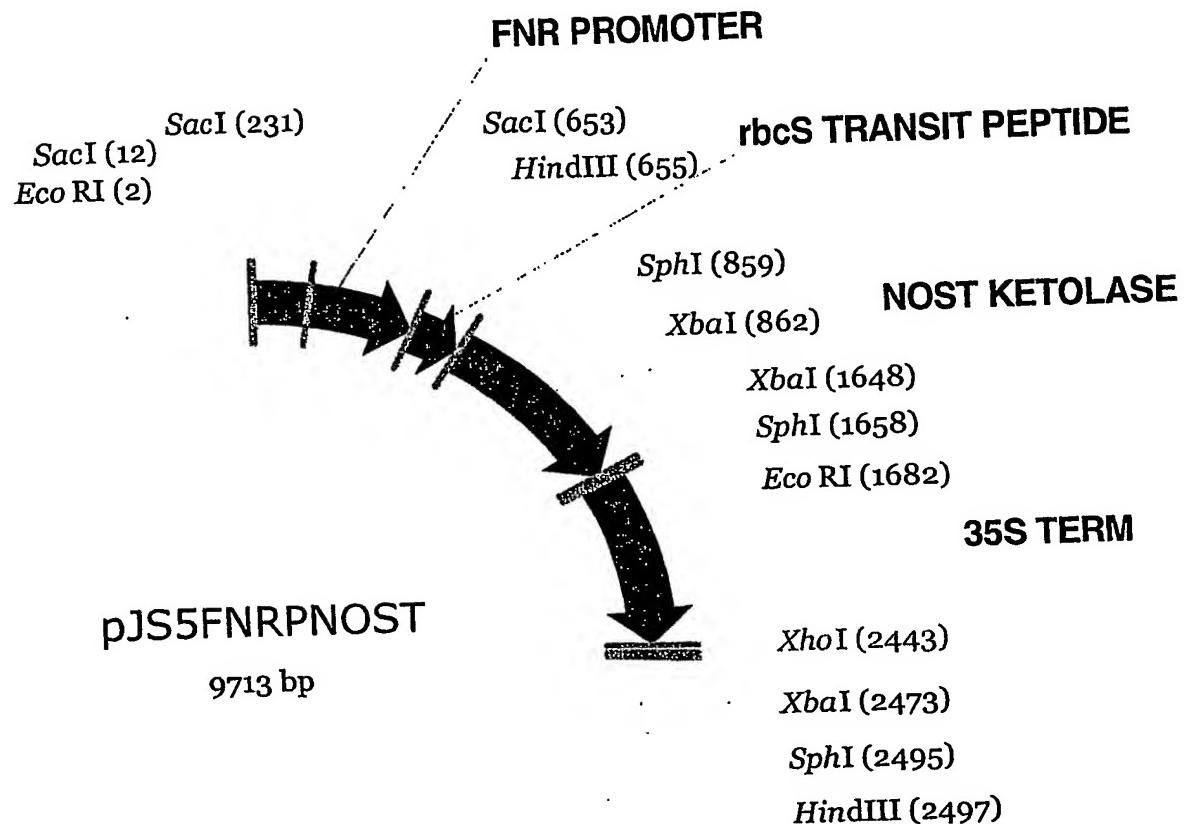


Abbildung 6

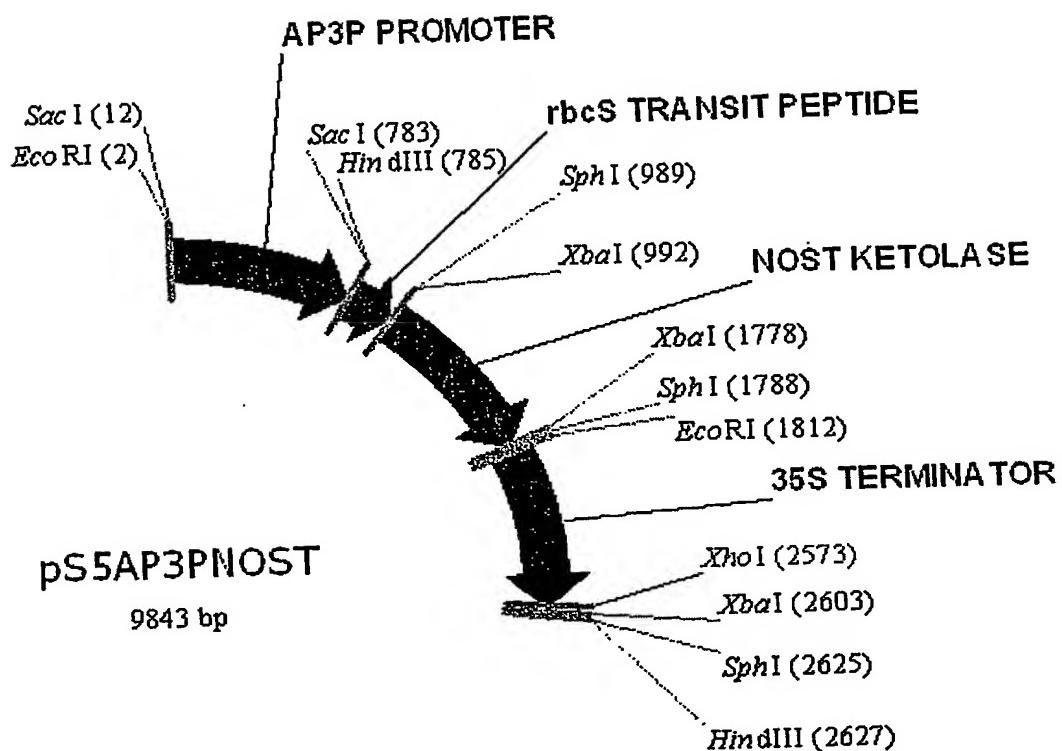
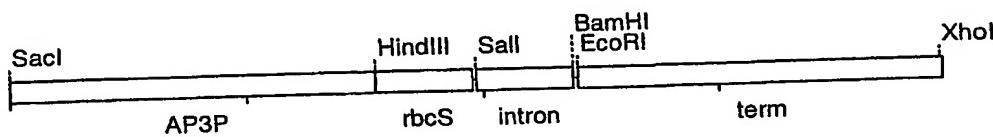


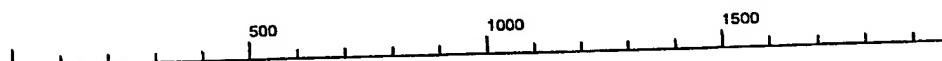
Abbildung 7:

Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-  
Repeat-Expressionskassetten für die blüten-  
spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs  
in *Tagetes erecta*

5



10



**pJAI1** (1966 bps)

20

25

Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

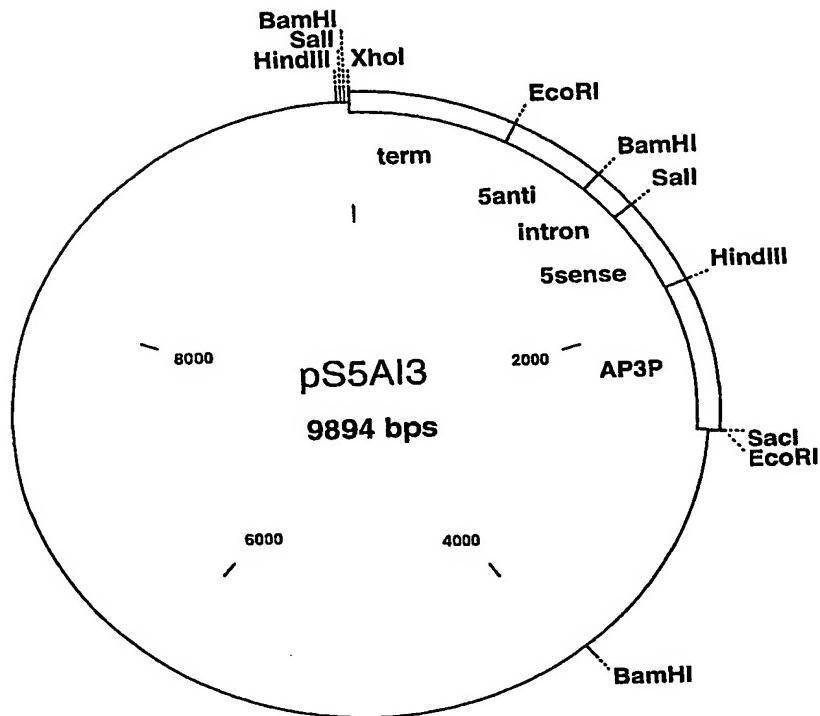


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

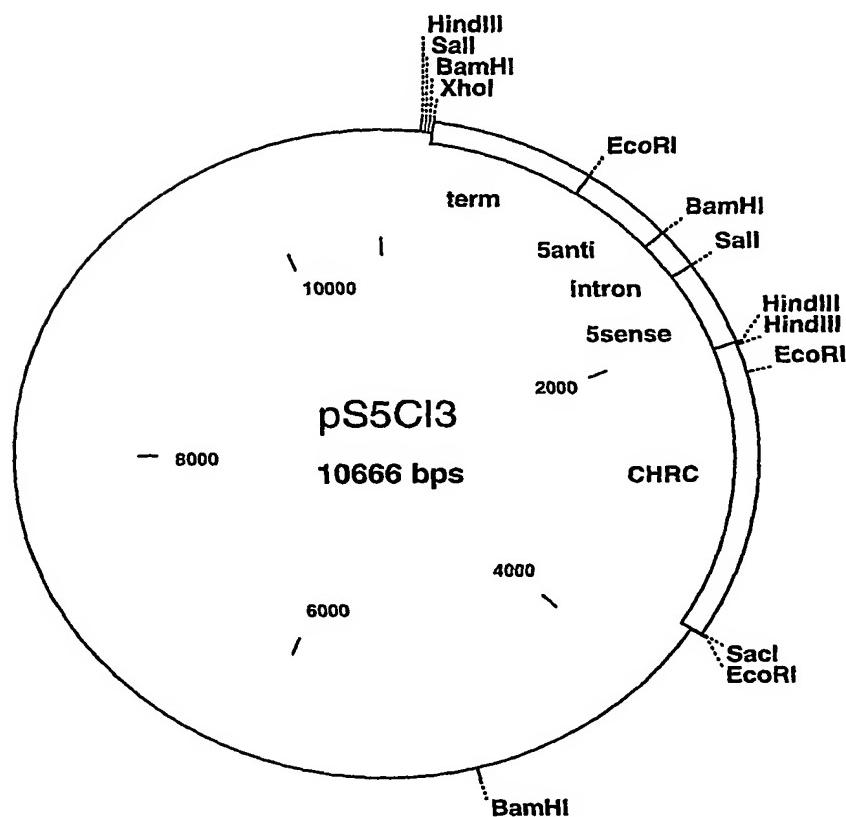


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminalen Fragmenten der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

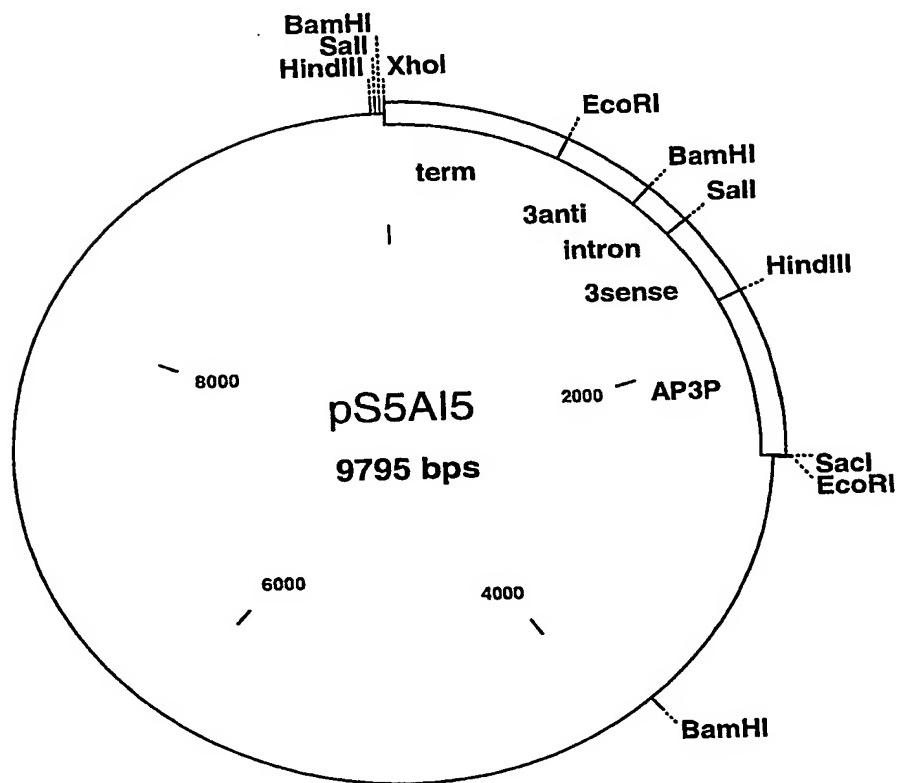
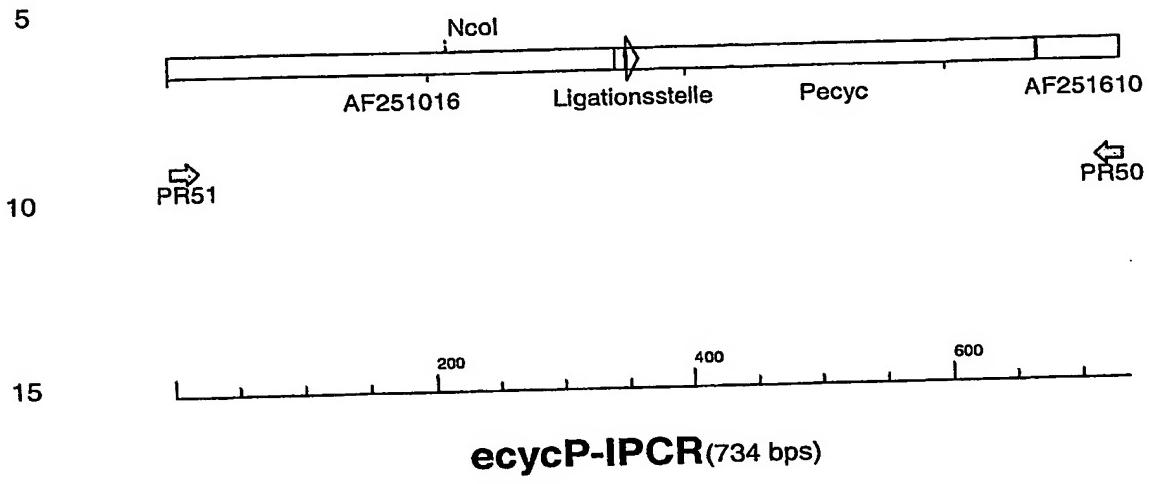


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält



20

25

12/15

Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment  
des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

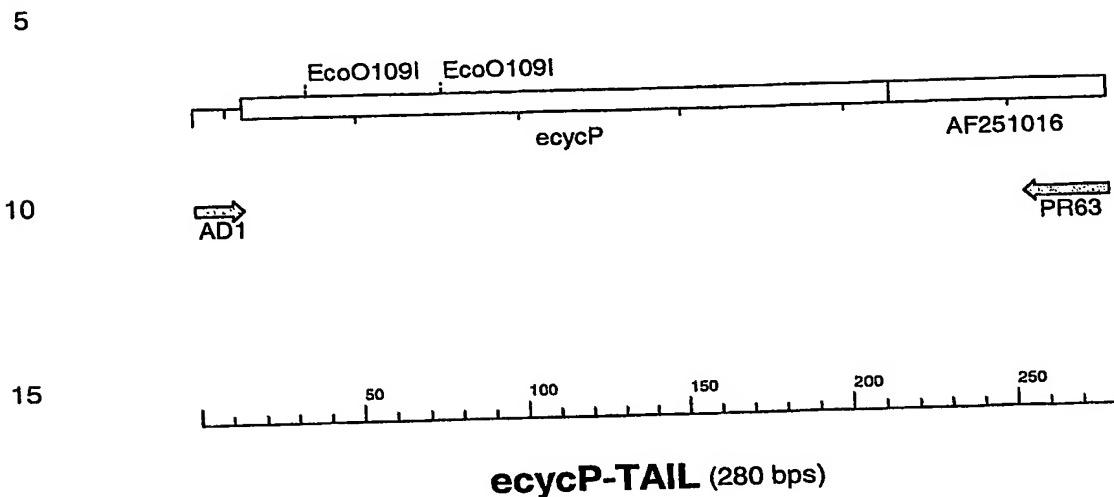
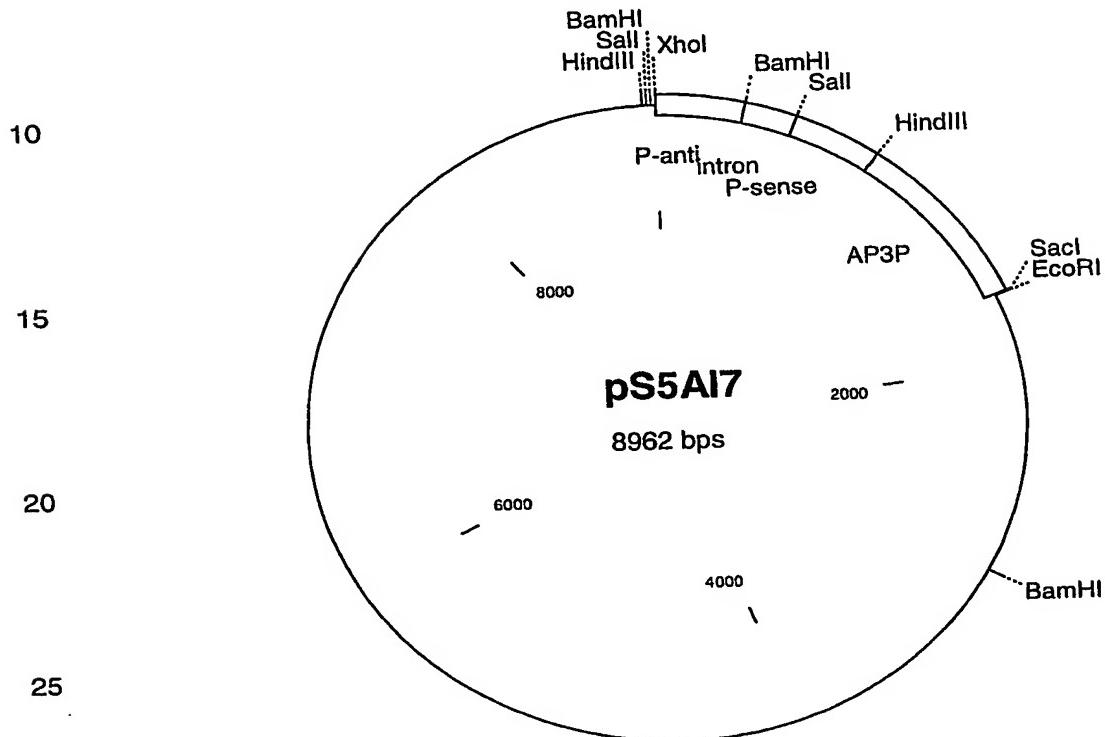


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5



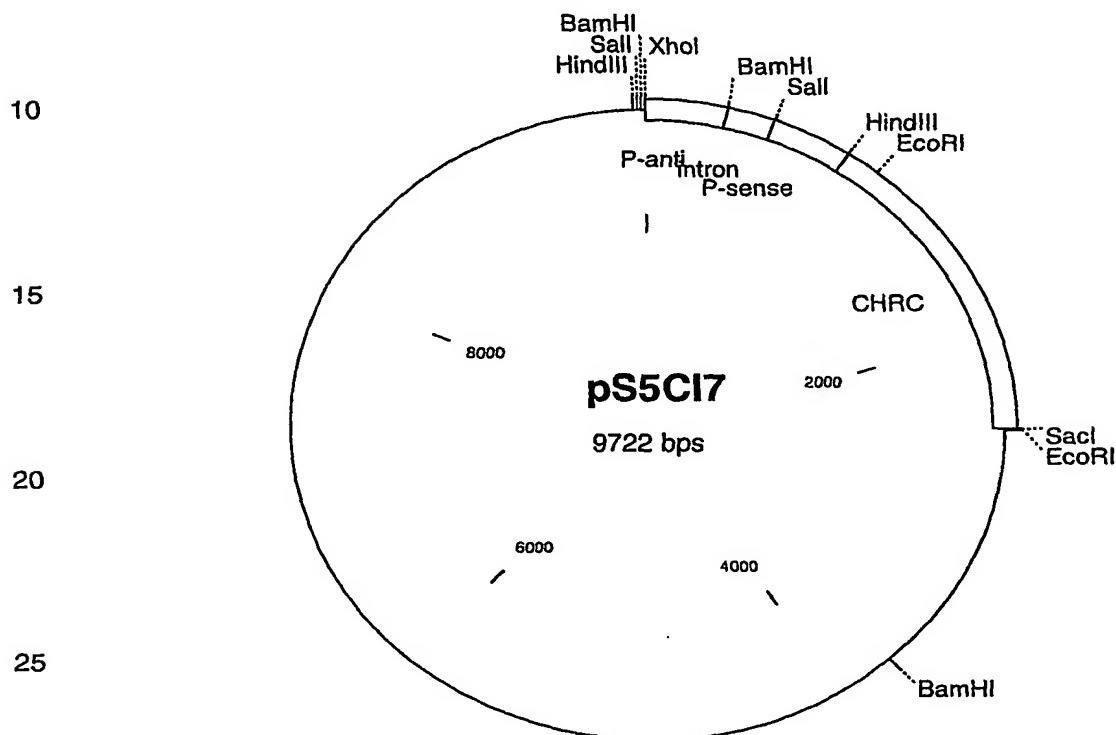
20

25

30

Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

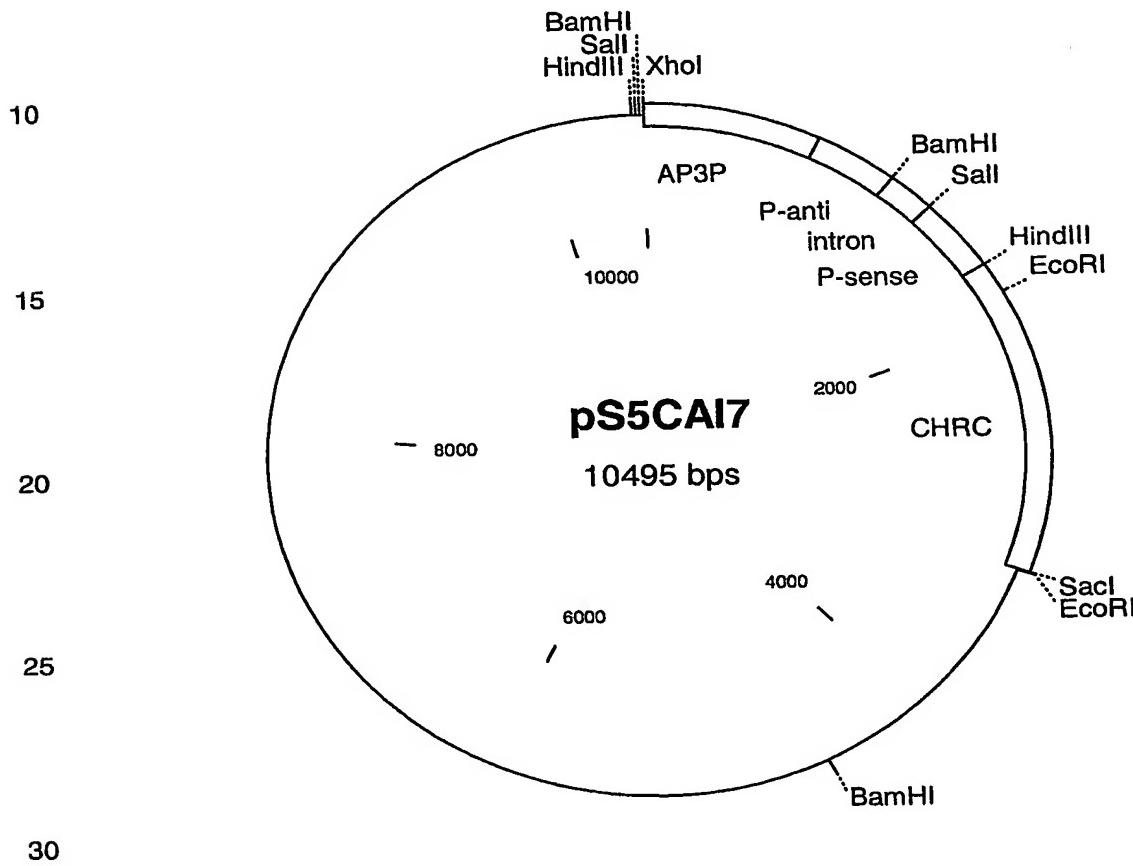
5



30

15/15

**Abbildung 15:** Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH Co. KGaA

10 <120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der  
Gattung Tagetes als Futtermittel

15 <130> PF 54148

20 <160> 142

25 <170> PatentIn version 3.1

30 <210> 1

<211> 1771

35 <212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

40 <220>

<221> CDS

45 <222> (166)..(1155)

<223>

50 <400> 1  
ggcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccggtc cacagcctca 60  
aataataaaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgcccttgaac 120  
ccgcgagtct cccgcccac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177  
Met Gln Leu Ala  
1

	gct gca gtc atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys 5	10	15	20	225
5	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp 25	30	35		273
10	gct acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gct gcc cgc ccg Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro 40	45	50		321
15	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile 55	60	65		369
20	aca atg gct cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70	75	80		417
25	gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85	90	95	100	465
30	ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105	110	115		513
35	ctg ctc gac atc gtc gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120	125	130		561.
40	ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135	140	145		609
45	aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150	155	160		657
50	tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165	170	175	180	705
	cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185	190	195		753
	aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met 200	205	210		801
	tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln				849

3

	ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala	897
5	230 235 240	
	ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro	945
	245 250 255 260	
10	cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met	993
	265 270 275	
15	aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe	1041
	280 285 290	
20	ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro	1089
	295 300 305	
25	ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg	1137
	310 315 320	
	ggc ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcaatggc cctgctgcc Gly Leu Val Pro Ala	1185
	325	
30	gctggcatg caggttgtgg caggactgg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgcc gacacgctgc atggctacc ctgtgttagt gcccacta ggggaggggg ttttagctg	1245
		1305
35	tgcagcttgc cccatggatg aagctgtgt a gttgtgcagg gatcaccc acaggccaa acccttgcag gagatgtctt gcttcggag gatgtttggg cagttagat gctatgattt	1365
		1425
40	tatcttaatg ctgaaggcatt taggggagcg acacttagt gttgtgcagg aacggccctgc aagggtcagg cacaagctag gctggacgag gactcggtgg caggcaggat aagagggtcg	1485
		1545
45	ggagggttgtt gccacaccca ctggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tggcagg agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gttttagcag tctcacttat tctttgat	1605
		1665
	agatacttgtt caggcaggatc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgc ccctgcgcatt atgaagctgt aacaataaa tggttcaaaa aaaaaaa	1725
		1771
50		

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 2

10 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15  
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala15 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30  
Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val20 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
35 40 45  
Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp25 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60  
Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp30 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80  
Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala35 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95  
Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp40 35 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110  
Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu45 40 115 120 125  
Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140  
Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly50 45 145 150 155 160  
Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys

165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

5 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

10 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

15 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

20 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

25 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
30 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

35 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

40 <210> 3

<211> 1662

45 <212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

50 <220>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

5

<400>	3		60	
cggggcaact caagaaaattc aacagctgca agcgcccc agcctcacag cgccaaagtga				
10	gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg			120
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc			176	
			Met His Val	
			1	
15	gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc			224
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser				
5 10 15				
20	agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc			272
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser				
20 25 30 35				
25	gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct			320
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro				
40 45 50				
30	cca gca tct gac gcc aag ggc .atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc			368
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly				
55 60 65				
35	acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata tttcaa atc agg cta ccg			416
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro				
70 75 80				
40	aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc			464
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala				
85 90 95				
45	cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc			512
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe				
100 105 110 115				
50	att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac			560
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp				
120 125 130				
55	gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc			608
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu				
135 140 145				
60	ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg			656
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met				
150 155 160				

	ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly 165	170	175	704	
5	aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe 180	185	190	195	752
10	gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cg <sup>g</sup> ctg Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu 200	205	210		800
15	gca tgg tgg gca gtg gtg atg c <sup>a</sup> atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn 215	220	225		848
20	ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu 230	235	240		896
	ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala 245	250	255		944
25	gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala 260	265	270	275	992
30	tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp 280	285	290		1040
35	gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys 295	300	305		1088
40	cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala 310	315	320		1130
	cctggtcctt ccgcgttgta cccagcgtct gcacaaggagt gtcatgctac agggtgctgc ggccagttgc agcgcagtgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca				1190
45	ctggcatgc cactgagcac tggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctggca gtggcttagga tggagtttga				1250
50	tgcattcagt agcggtggcc aacgtcatgt ggatggtggaa agtgctgagg ggtttaggca gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcatgctgc tc <sup>a</sup> atgcac atatctgcac acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atggacact tggatggtt tcgtgctatt				1310
					1370
					1430
					1490
					1550

gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

5

<210> 4

<211> 320

10

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

15

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala  
20 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His  
20 25 30

25

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
35 40 45

30

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
50 55 60

35

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
65 70 75 80

40

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
85 90 95

45

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
100 105 110

50

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
145 150 155 160

5 Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
10 180 185 190

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
195 200 205

15 Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
210 215 220

20 Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
225 230 235 240

25 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
245 250 255

30 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
275 280 285

35 Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
290 295 300

40 Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
305 310 315 320

45 <210> 5

<211> 729

<212> DNA

50 <213> Agrobacterium aurantiacum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1)..(729)

&lt;223&gt;

10

<400> 5  
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

15 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

20 gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144  
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
35 40 45

25 aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

30 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

35 gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

40 cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

45 cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ccc 384  
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

50 gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac 480  
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc 528  
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

	gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg	576
	Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	
	180	185
5	gac cgc cac aat gcg ccg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg	624
	Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu	
	195	200
	205	
10	ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac	672
	Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His	
	210	215
	220	
15	ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac	720
	Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp	
	225	230
	235	240
	acc gca tga	729
	Thr Ala	
20		
	<210> 6	
25	<211> 242	
	<212> PRT	
	<213> Agrobacterium aurantiacum	
30		
	<400> 6	
35	Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	1
		5
		10
		15
	Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
40		20
		25
		30
	Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	
	35	40
	45	
45	Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
	50	55
	60	
50	His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	
	65	70
	75	80

12

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

5 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
10 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

15 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

20 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

25 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

30 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

35 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

40 Thr Ala

45 <210> 7

<211> 1631

<212> DNA

50 <213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

5 <222> (99) .. (827)

<223>

10 <400> 7  
 ctgcaggccg ggcccggtgg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60  
 ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
 Met Ser Gly Arg Lys Pro  
 15 1 5

● ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
 20 10 15 20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
 25 30 35

25 gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr  
 40 45 50

30 tgg ctg tcg gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
 55 60 65 70

35 tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc gggcaa ctg 356  
 Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ile Gly Gln Leu  
 75 80 85

● gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tcg tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404  
 Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys  
 40 90 95 100

cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452  
 His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe  
 105 110 115

45 ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500  
 Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr  
 120 125 130

50 ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548  
 Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr  
 135 140 145 150

gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596

	Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val			
	155	160	165	
5	ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu		644	
	170	175	180	
10	ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg		692	
	185	190	195	
15	tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe		740	
	200	205	210	
20	ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp		788	
	215	220	225	230
25	cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala		837	
	235	240		
	cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat		897	
30	tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc gttggagaag aacgacactct acggcgctgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttac		957	
	50	1017		
35	cgtggcgcc tattggtggc cggtgctgtg gtggatcgcc ctggcatga cggcttatgg gttgatctat ttcatcctgc acgacggct tttgcataa cgctggccgt ttccgtatat		1077	
	55	1137		
40	tccggcgcc ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgcctgcacc acgcggctga gatccggcg tggccgcatt aaatccgacg tgctgctggc agggccggc cttgccaacg		1197	
	60	1257		
45	gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct		1317	
	65	1377		
50	gtccggcgcc ggcctcgac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcgggt		1437	
	70	1497		
55	tcccagacca ttcgcaagg ctccggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga		1557	
	75	1617		
60	tgcggt gacc		1631	

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Alcaligenes sp.

&lt;400&gt; 8

10 Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
1 5 10 1515 Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
20 25 3020 Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
35 40 4525 Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 8030 Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 9535 Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 11040 Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
115 120 125Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 14045 Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 16050 Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
 180 185 190

5 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

10 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

15 Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
 225 230 235 240

Arg Ala

20 <210> 9.

<211> 729

25 <212> DNA

<213> Paracoccus marcusii

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1) .. (729)

<223>

40 <400> 9  
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 5 10 15  
 1

45 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

50 gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192

	Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala			
	50	55	60	
5	cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn			240
	65	70	75	80
10	gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp			288
	85	90	95	
15	cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr			336
	100	105	110	
20	gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala			384
	115	120	125	
25	cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro			432
	130	135	140	
30	gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr			480
	145	150	155	160
35	gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe			528
	165	170	175	
40	gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro			576
	180	185	190	
45	gac cgc cat aat gcg ccg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu			624
	195	200	205	
50	ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His			672
	210	215	220	
55	ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp			720
	225	230	235	240
	acc gca tga			729
	Thr Ala			

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Paracoccus marcusii

&lt;400&gt; 10

10 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 1515 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 3020 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
35 40 4525 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 8030 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 9535 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 11040 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 12545 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160  
50 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

PF 54148

19

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

5 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
10 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

15

Thr Ala

20

<210> 11

<211> 1629

25 <212> DNA

<213> Synechococcus sp.

30

<220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(1629)

<223>

40

<400> 11  
atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta  
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
1 5 10 15

48

45

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta  
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
20 25 30

96

50

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg  
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
35 40 45

144

ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac

192

	Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His			
	50	55	60	
	gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag			240
5	Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln			
	65	70	75	80
	tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg			288
10	Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly			
	85	90		95
	ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt			336
	Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys			
	100	105	110	
15	gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa			384
	Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln			
	115	120	125	
20	ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt			432
	Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe			
	130	135	140	
25	aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg			480
	Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp			
	145	150	155	160
30	gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg			528
	Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala			
	165	170	175	
	ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat			576
	Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn			
	180	185	190	
35	gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt			624
	Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys			
	195	200	205	
40	tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg			672
	Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met			
	210	215	220	
45	atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga			720
	Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly			
	225	230	235	240
50	ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa			768
	Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln			
	245	250	255	
	ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa			816
	Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu			
	260	265	270	

	aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cg		864
	Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg		
	275 280 285		
5	gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg		912
	Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu		
	290 295 300		
10	caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg		960
	Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly		
	305 310 315 320		
15	gaa cga ctg gaa cg <sup>g</sup> cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa		1008
	Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys		
	325 330 335		
20	atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg		1056
	Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly		
	340 345 350		
	ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat		1104
	Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His		
	355 360 365		
25	gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct		1152
	Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala		
	370 375 380		
30	aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg		1200
	Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met		
	385 390 395 400		
35	gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttg gcc ccc tac		1248
	Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr		
	405 410 415		
40	cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt ttg acc		1296
	Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr		
	420 425 430		
	gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg		1344
	Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr		
	435 440 445		
45	gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa		1392
	Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu		
	450 455 460		
50	agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc		1440
	Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val		
	465 470 475 480		
	tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta		1488

22

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

5 ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca 1536  
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

10 ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584  
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

15 aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629  
 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

15

&lt;210&gt; 12

20

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechococcus sp.

25

&lt;400&gt; 12

30 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

35 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

35

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

40

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

45 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

50 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
115 120 125

5

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
130 135 140

10

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
145 150 155 160

15

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
165 170 175

20

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
180 185 190

25

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
195 200 205

30

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

35

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

40

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

45

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

50

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
325 330 335

5 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
340 345 350

10 Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
355 360 365

15 Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
370 375 380

20 Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
385 390 395 400

25 Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
405 410 415

30 Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
420 425 430

35 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
435 440 445

40 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
450 455 460

45 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
465 470 475 480

50 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
485 490 495

55 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
500 505 510

55 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
515 520 525

60 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
530 535 540

<210> 13  
 5 <211> 776  
 <212> DNA  
 10 <213> *Bradyrhizobium* sp.  
 10  
 <220>  
 15 <221> CDS  
 ● <222> (1)..(774)  
 20 <223>  
 20  
 <400> 13  
 25 atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48  
 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
 1 5 10 15  
 30 gac gat gcg agg cag cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96  
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30  
 35 atc gcc gcc tgg ctg gtg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144  
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45  
 40 ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg ctg cag 192  
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60  
 45 acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240  
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80  
 50 ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288  
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95  
 55 ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110  
 60 gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384  
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125

	ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt	432
	Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe	
	130 135 140	
5	ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc	480
	Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val	
	145 150 155 160	
10	tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg	528
	Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu	
	165 170 175	
15	ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc	576
	Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr	
	180 185 190	
20	ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat	624
	Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp	
	195 200 205	
25	cgc cac aac gcg ccg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg	672
	Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu	
	210 215 220	
	acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat	720
	Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp	
	225 230 235 240	
30	gcg ccg tgg tgg ccg ctg ccg gag atc aag ccg ccg gcc ctg gaa agg	768
	Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg	
	245 250 255	
35	cgt gac ta	776
	Arg Asp	
40	<210> 14	
	<211> 258	
	<212> PRT	
45	<213> Bradyrhizobium sp.	
50	<400> 14	
	Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
	1 5 10 15	

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30

5 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 10 50 55 60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80  
 15

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95

20 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110

25 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125

30 Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
 130 135 140

35 Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

40 165 170 175  
 Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
 180 185 190

45 Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205

50 Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
 210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
 225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
245 250 255

5

Arg Asp

10

<210> 15

<211> 777

15 <212> DNA

<213> Nostoc sp.

20

<220>

<221> CDS

25 <222> (1) .. (777)

<223>

30

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta  
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt  
 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
           20                 25                 30

40

40 att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

45 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192  
 Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60

	atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat	240
	Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
50	65 70 75 80	

gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat	288	
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn		
85	90	95

	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys 100	105	110	336	
5	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp 115	120	125	384	
10	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp 130	135	140	432	
15	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly 145	150	155	160	480
20	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu 165	170	175	528	
25	aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val 180	185	190	576	
30	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly 195	200	205	624	
35	gtt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe 210	215	220	672	
40	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His 225	230	235	240	720
45	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile 245	250	255	768	
50	tct tta taa Ser Leu			777	
	<210> 16				
	<211> 258				
	<212> PRT				
	<213> Nostoc sp.				

&lt;400&gt; 16

5 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
 1 5 10 15

10 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

15 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60

20 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

25 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

30 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

35 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

40 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

45 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

50 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210                    215            .            220

5

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

10

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
245 250 255

15 Ser Leu

20 <210> 17

### 25. *Monachoscopus salvini*

<220>

30

25 122

<400>

```

<400> 17
40 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc
      Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile
           1          5          10         15

```

```

45 ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg
      Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu
          20           25           30

```

50	35	40	45
	Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val	Lys Ala Arg Arg Val	Glu Leu Ala

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg  
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
 50 55 60

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga		239
Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly		
65	70	75
5		
acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca		287
Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala		
80	85	90
10		
ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa		335
Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys		
100	105	110
15		
cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc		383
Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly		
115	120	125
20		
gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac		431
Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His		
130	135	140
25		
atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc		479
Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu		
145	150	155
30		
ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat		527
Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr		
160	165	170
35		
195	200	205
40		
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg		623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu		
180	185	190
45		
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc		671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly		
210	215	220
50		
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg		719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu		
225	230	235
45		
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg		767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu		
240	245	250
50		
255		
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg		815
Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met		
260	265	270
45		
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt		863

Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly  
 275 280 285

5 ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att 911  
 Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile  
 290 295 300

10 cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg 959  
 Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp  
 305 310 315

15 tcc aag cgg tag ggtgcggAAC caggcacgct ggttcacac ctcatgcctg 1011  
 Ser Lys Arg  
 320

20 tgataaggtg tggctagAGC gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggTCG actggTctGA 1071  
 tggccaatgg catcggccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtatG 1131  
 cacatcatca tgtgcggTTG gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191  
 caggctggcg ttgaatcagt gagggTTGT gattggcggt tgtgaagcaa tgactccGCC 1251  
 catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcATG gatcatggta 1311  
 25 gtgcagcaaa ctatattcac cttagggctgt tggtaggatc aggtgaggCC ttgcacattG 1371  
 catgatgtac tcgtcatggt gtgttgtGA gaggatggat gtggatggat gtgtattCTC 1431  
 30 agacgttagAC cttgactgga ggcttgatCG agagagtggg ccgtattCTT tgagagggGA 1491  
 ggctcgtGCC agaaatggTG agtggatgAC tgtgacgCTG tacattgcAG gcaggTgaga 1551  
 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcAG atgaaaaaaaaaaaaaaa 1608  
 35

40 <210> 18

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

45 <400> 18

50 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
35 40 45

5 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
50 55 60

10 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
65 70 75 80

15 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
85 90 95

20 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
100 105 110

25 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ser Ile Gly Val  
115 120 125

30 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
130 135 140

35 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
145 150 155 160

40 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
165 170 175

45 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
180 185 190

50 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
225 230 235 240

35

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255

5 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

10 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

15 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

20 Lys Arg

25 <210> 19

<211> 1503

<212> DNA

30 <213> Tomate

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

40 <223>

45 <400> 19 48  
 atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

50 cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96  
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144

	His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val		
	35	40	45
5	tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr 50 55 60		192
10	aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys 65 70 . 75 80		240
15	ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggc cct gca gga ctt Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Pro Ala Gly Leu 85 90 95		288
20	gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile 100 105 110		336
25	gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val 115 120 125		384
30	gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp 130 135 140		432
35	tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His 145 150 155 160		480
40	aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met 165 170 175		528
45	cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile 180 185 190		576
50	aag gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly 195 200 205		624
	att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg 210 215 220		672
	tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala 225 230 235 240		720
	tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys 245 250 255		768

	atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp 260	265	270	816
5	ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro 275	280	285	864
10	ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg 290	295	300	912
15	cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu 305	310	315	960
20	aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys 325	330	335	1008
25	cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val 340	345	350	1056
30	gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met 355	360	365	1104
35	gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile 370	375	380	1152
40	caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr 385	390	395	1200
45	gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu 405	410	415	1248
50	ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala 420	425	430	1296
55	aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp 435	440	445	1344
60	cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe 450	455	460	1392
65	ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata 1440			

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta 1488  
 5 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

cag gat aaa gaa tga 1503  
 Gln Asp Lys Glu  
 10 500

<210> 20

15 <211> 500

<212> PRT

<213> Tomate

20

<400> 20

25 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 30 20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
 35 40 45

35

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
 50 55 60

40 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
 65 70 75 80

45 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
 85 90 95

50 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
 100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
 115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
130 135 140

5

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
145 150 155 160

10

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
165 170 175

15

Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
180 185 190

20

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
195 200 205

25

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
210 215 220

30

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
245 250 255

35

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
260 265 270

40

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
275 280 285

45

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
305 310 315 320

50

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
325 330 335

40

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
340 345 350

5 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
355 360 365

10 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
370 375 380

15 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
405 410 415

20 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
420 425 430

25 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
435 440 445

30 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
450 455 460

35 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
485 490 495

40 Gln Asp Lys Glu  
500

45 <210> 21

<211> 195

<212> DNA

50 <213> Kartoffel

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

5 &lt;222&gt; (1)..(195)

&lt;223&gt;

10

<400> 21  
 tacgttaagtt tctgcttcta cctttgat atatataata attatcatta attagtagta 60  
 atataatattt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt  
 120  
 15 ctgtagttta taagtgtgta tatttaatt tataactttt ctaatataatg accaaaattt  
 180  
 gttgatgtgc agctg 195

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1155

25 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

35 &lt;222&gt; (6)..(995)

&lt;223&gt;

40

<400> 22  
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15  
 20

45

gct gag gca ctc aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
 20 25 30

50

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146  
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser  
 35 40 45  
 gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194

## 42

	Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser		
	50	55	60
	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc		242
5	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala		
	65	70	75
	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg		290
	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu		
10	80	85	90
	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt		338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val		
	100	105	110
15	agc ggc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg		386
	Ser Gly Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu		
	115	120	125
20	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat		434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His		
	130	135	140
25	ggc acc atc gcc atg aga aac agg ctt aat gac ttc ttg ggc aga		482
	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg		
	145	150	155
	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc		530
	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg		
30	160	165	170
	175		
	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct		578
	Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro		
	180	185	190
35	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc		626
	Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe		
	195	200	205
40	atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg		674
	Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp		
	210	215	220
45	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg		722
	Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val		
	225	230	235
	tcc atg gcg gcc ggc ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt		770
	Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe		
50	240	245	250
	255		
	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct		818
	Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser		
	260	265	270

866

tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser 275 280 285	
5	
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu 290 295 300	914
10	
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg 305 310 315	962
15	
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtggc Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala 320 325	1015
20	
cctgctgcca gctgggcatg cagggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggg gctgctgccc gacacgctgc atgggctacc ctgtgttagct gccgccacta ggggaggggg ttttagctg tcgagcttgc	1075 1135 1155
25	<210> 23
	<211> 329
	<212> PRT
30	<213> Haematococcus pluvialis
35	<400> 23
	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala 1 5 10 15
40	Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val 20 25 30
45	Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp 35 40 45
50	Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp 50 55 60

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95

5

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110

10

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

15

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

20

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

25

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

30

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

35

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

40

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

45

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

50

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

45

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290                            295                            300

5 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305                            310                            315                            320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 10                            325

<210> 24

15 <211> 1111

<212> DNA

20 <213> Haematococcus pluvialis

30 <220>  
 25 <221> CDS  
 <222> (4) .. (951)

<223>  
 30 <400> 24  
 tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc      48  
 35 Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser  
 1                5                10                15

tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa      96  
 Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu  
 40                20                25                30

gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca      144  
 Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro  
 35                40                45

45 cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc      192  
 Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser  
 50                55                60

50 tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc      240  
 Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr  
 65                70                75

tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag      288

Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	
80				85					90			95				
ctg gtt agc ggc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt															336	
5	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Phe	Phe	
					100				105			110				
gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct															384	
	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala
10					115				120			125				
atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg															432	
	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu
					130			135			140					
15	ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg															480
	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu
					145			150			155					
20	cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag															528
	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	
					160			165			170			175		
25	gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc															576
	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala
					180			185			190					
30	agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca															624
	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala
					195			200			205					
35	tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg															672
	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu
					210			215			220					
40	ctg gtg ttc atg gcg gcc ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc															720
	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe
					225			230			235					
45	tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca															768
	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser
					240			245			250			255		
50	ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag															816
	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln
					260			265			270					
	gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac															864
	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His
					275			280			285					
	tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac															912
	Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro	Trp	Trp	Glu	Leu	Pro	Asn
					290			295			300					

tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac	961
Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala	
305 310 315	
5	
tgcagtggc cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa	1021
agctgcagggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgttagct gccgcccacta	1081
10 ggggagggggg tttgttagctg tcgagcttgc	1111
<210> 25	
15 <211> 315	
<212> PRT	
<213> Haematococcus pluvialis	
20	
<400> 25	
25 Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser	
1 5 10 15	
Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu	
30 20 25 30	
Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro	
35 35 40 45	
Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp	
50 55 60	
40 Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser	
65 70 75 80	
45 Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu	
85 90 95	
50 Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val	
100 105 110	
Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met	
115 120 125	

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
130 135 140

5

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
145 150 155 160

10

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
165 170 175

15

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
180 185 190

20

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
195 200 205

25

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
210 215 220

30

Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
225 230 235 240

35

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
245 250 255

40

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala

260 265 270

45

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys

290 295 300

50

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
305 310 315

<210> 26

<211> 1031

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

5

<220>

<221> CDS

10

<222> (6)..(1031)

<223>

15

<400> 26  
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15  
 50  
 gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
 20 25 30  
 98  
 gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca  
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser  
 35 40 45  
 146  
 gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc  
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser  
 50 55 60  
 194  
 gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct  
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala  
 65 70 75  
 242  
 gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg  
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu  
 80 85 90 95  
 290  
 gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt  
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val  
 100 105 110  
 338  
 agc ggc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg  
 Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu  
 115 120 125  
 386  
 gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat  
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His  
 130 135 140  
 434  
 ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga

	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg			
	145	150	155	
	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc			530
5	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg			
	160	165	170	175
	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct			578
	Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro			
10	180	185	190	
	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc			626
	Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe			
	195	200	205	
15	atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg			674
	Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp			
	210	215	220	
20	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg			722
	Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val			
	225	230	235	
25	ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt			770
	Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe			
	240	245	250	255
	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct			818
	Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser			
30	260	265	270	
	tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc			866
	Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser			
	275	280	285	
35	gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag			914
	Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu			
	290	295	300	
40	cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc			962
	His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg			
	305	310	315	
45	cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca			1010
	Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser			
	320	325	330	335
	gaa gag gat ctg aat agc tag			1031
	Glu Glu Asp Leu Asn Ser			
50	340			

&lt;211&gt; 341

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 27

10

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30

20

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
35 40 45

25

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60

30

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80

35

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95

40

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110

45

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

50

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

5 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

10 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

15 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

20 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

25 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

30 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

35 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
325 330 335

40 Glu Asp Leu Asn Ser  
340

45 <210> 28

<211> 777

<212> DNA

50 <213> Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

5 &lt;222&gt; (1)..(777)

&lt;223&gt;

10

<400> 28  
gagctcaactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgtat gaactaagat caatccatgt 60

tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagtttg aaacaacact aactggtcga 120

15 agcaaaaaaga aaaaagagtt tcatacatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180

ccaaacatta tctacaaaca aagactttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240

20 ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgtat 300

atcatttggg gaaacatata aaagatttga gtttagatgga agtgcgatt aatccaaaca 360

25 tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420

acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttgc ttacttttag ggtaagtgc 480

aaaagccaaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgcccgtt aagtcgatgt 540

30 ccgttgattt aaacagtgtc ttgttaattaa aaaaatcagt ttacataaaat ggaaaattta 600

tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660

tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatccact 720

35 tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatac tcttcaacaa aaagctt 777

40 &lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; kuenstlich

50 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(22)

&lt;223&gt;

5 <400> 29 22  
gcaagctcg a cagctacaaa cc

10 <210> 30

<211> 24

<212> DNA

15 <213> kuenstlich

20 <220>

<221> primer\_bind

<222> (1) .. (24)

25 <223>

30 <400> 30 24  
gaagcatgca gctagcagcg acag

35 <210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

40

<220>

45 <221> primer\_bind

<222> (1) .. (30)

<223>

50

<400> 31  
tgcatgctag aggcaactcaa ggagaaggag

30

5 <211> 59

10 <212> DNA

15 <213> kuenstlich

20 <220>

25 <221> primer\_bind

30 <222> (1)..(59)

35 <223>

40 <400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag ttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

45 <210> 33

50 <211> 28

55 <212> DNA

60 <213> kuenstlich

65 <220>

70 <221> primer\_bind

75 <222> (1)..(28)

80 <223>

85 <400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

90 <210> 34

95 <211> 37

<212> DNA  
<213> kuenstlich  
5  
<220>  
10 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(37)  
<223>  
15  
<400> 34 37  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc  
20 <210> 35  
<211> 34  
25 <212> DNA  
<213> kuenstlich  
30 <220>  
<221> primer\_bind  
35 <222> (1)..(34)  
<223>  
40 <400> 35 34  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac  
45 <210> 36  
<211> 25  
<212> DNA  
50 <213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

5 <222> (1)..(25)

<223>

10 <400> 36 taagctttt gttgaagaga tttgg 25

15 <210> 37

<211> 212

<212> DNA

20 <213> Kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Intron

<222> (1)..(212)

30 <223>

35 <400> 37 gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatata ataataatta tcattaatta 60  
gtatgtatata atatatttcaa atatttttt caaaataaaaa gaatgttagta tatagcaattt  
40 gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
aaatttggtt atgtgcaggt atcaccggat cc 212

45 <210> 38

<211> 1830

<212> DNA

50 <213> Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (141)..(1691)

&lt;223&gt;

10

<400> 38  
 ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttggat atttctctctcgatccaaaca 60  
 gatacaaggc gtgactggat atttctctctcgatccaaaca aacagcaacg aagaagaaaa

15 agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

20 atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221  
 Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr  
 15 20 25

25 aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269  
 Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln  
 30 35 40

30 gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg 317  
 Glu Ile Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu  
 45 50 55

35 ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365  
 Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser  
 60 65 70 75

40 cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gac agt 413  
 Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser  
 80 85 90

45 aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461  
 Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu  
 95 100 105

50 gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509  
 Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile  
 110 115 120

55 ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557  
 Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu  
 125 130 135

60 ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat 605  
 Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp  
 140 145 150 155

	act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653		
	Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala			
	160	165	170	
5	tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701		
	Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg			
	175	180	185	
10	tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749		
	Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile			
	190	195	200	
15	act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797		
	Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile			
	205	210	215	
20	aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845		
	Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly			
	220	225	230	235
	aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893		
	Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr			
	240	245	250	
25	gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941		
	Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser			
	255	260	265	
30	cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989		
	Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln			
	270	275	280	
35	tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037		
	Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser			
	285	290	295	
40	cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085		
	Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala			
	300	305	310	315
	atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133		
	Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr			
	320	325	330	
45	atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181		
	Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Trp Ser Tyr Ile			
	335	340	345	
50	cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229		
	Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe			
	350	355	360	
	ggt gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277		

## 60

Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val			
365	370	375	
5	aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile		1325
	380	385	395
10	tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr		1373
	400	405	410
15	acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg		1421
	415	420	425
20	aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln		1469
	430	435	440
25	atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Arg Leu		1517
	445	450	455
30	ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr		1565
	460	465	470
35	gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser		1613
	480	485	490
40	ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly		1661
	495	500	505
45	aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactcttag tcgcgatcag Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile		1711
	510	515	
50	tttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcatcaa ttgtatttct tgggttaatg ctgatgaagt attttctgg		1771
			1830
45	<210> 39		
	<211> 516		
	<212> PRT		
50	<213> Tagetes erecta		

&lt;400&gt; 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
1 5 10 15

5

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
20 25 30

10 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
35 40 45

15 Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
50 55 60

20 Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
65 70 75 80

25 Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
85 90 95

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
100 105 110

30 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
115 120 125

35 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
130 135 140

40 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
145 150 155 160

45 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
180 185 190

50 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
210 215 220

5 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
225 230 235 240

10 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
260 265 270

15 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
275 280 285

20 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
290 295 300

25 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
305 310 315 320

30 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
325 330 335

35 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
355 360 365

40 Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
370 375 380

45 Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
385 390 395 400

50 Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445

5

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460

10

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

15

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

20

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

25

Tyr Leu Thr Ile  
 515

30

<210> 40  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

35

<220>  
 <221> Sense Fragment  
 <222> (1) .. (445)  
 <223>

45

<400> 40		60
aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tggttgtt gttgagagac actccaatcc		
50 aaacagatac aaggcggtgac tggatatttc tctctcggttc ctaacaacag caacgaagaa		120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat		180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg		240

caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
gaaagccgggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaattgcaa cagaataagt ccatggatgc 360  
5 acagtcttagc ctatccaaa agctccaaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

10 <210> 41  
<211> 446  
15 <212> DNA  
<213> Tagetes erecta

20 <220>  
<221> Antisense Fragment  
25 <222> (1)..(446)  
<223>

30 <400> 41  
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tggtgttggt gttgagagac actccaatcc 60  
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtt ctaacaacag caacgaagaa 120  
35 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
ggcggctttt acatgcccta ggttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240  
40 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
gaaagccgggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaattgcaa cagaataagt ccatggatgc 360  
45 acagtcttagc ctatccaaa agctccaaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
ctgtatactg gatttggttg gatcct 446

50 <210> 42  
<211> 393  
<212> DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

5 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; Sense Fragment

&lt;222&gt; (1)..(393)

10

&lt;223&gt;

15 <400> 42  
aagctttgga tttagcactga ttgtccagat ggatatttag gggacccgca cattcttccg 60

gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgtttatcatc

20 aactgacttg ataataatatttgc cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180

gggtctgggtt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240

cacgatataa ataactctag tcgcgatcag ttttagattat aggcacatct tgcatatatata 300

25 tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcatcaa ttgtatttct 360

tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

30

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 397

35 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

40

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Antisense Fragment

45 &lt;222&gt; (1)..(397)

&lt;223&gt;

50

<400> 43  
gaattctt tggatttagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60

tccggacttt cttccgccttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttggaa tcttcgttat 120

	catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga	180
	gaatgggtct ggttagacat ttgcttcgt acccgacagg aggaacaatg taaaaggcgt	240
5	atctcacat ataaataact ctatcgacga tcagttaga ttataggcac atcttcata	300
	tatatatgtt taaaacctat gtgtgctgtt tccttacatc aacacagtca ttaattgtat	360
10	ttcttgggtt aatgctgatg aagtattttc tggatcc	397
	<210> 44	
15	<211> 1537	
	<212> DNA	
	<213> -	
20	 	
	<220>	
25	<221> promoter	
	<222> (1)..(1537)	
	<223>	
30	 	
	<400> 44	
	gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgtaaattt	60
35	tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctactttct tattcatacc	120
	tattcactca agcctttacc atttccctt tctattcaa tactattct acttcatttt	180
40	tcacgtttt aacatcttc tttatattttt gtccacttcg ttttagggatg cctaattgtcc	240
	caaatttcat ctctcgttgtt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt	300
	aatacaaaata aagtgaaca aaatatctat aaataaacaat atatataat tttgttagac	360
45	gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaattttt gttatatttc tactttacat actaaatttg	420
	tttctcatat ttacctttt acccccacaa aaaaaattta taaaaaagaa agaaaaaagc	480
50	taaacccat ttaaatagct aactataaga tcttaaaattt atcctcatca gtgtatagtt	540
	taattggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctatgttattt	600
	ctcacatttt ttaacttaag aaaaatgtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat	660

	gctctaattt gattaacaaa aagtttagaaa tatttatTTA aataaaaaaAG actaataaaAT	720
5	atataaaATG aatgttcata cgcaGACCCa ttTAGAGATG agTATGCTT cacatGCTGA	780
	gattatTTc AAAACTAAGG ttGTagcaat attAAATCAA tAAAATTATT atAAATAACA	840
	aaATTAACCT gctcGTGTTT gctgtatATG ggaggctaca AAATAAATTA aactAAAGAT	900
10	gattatGTTT tagacatTTT ttcatCTGT attAGTTTAT acatATTAAT tcaggAGCTG	960
	cacaACCCaa ttctatTTc gttcCTTGGT ggctGGGTTT cTCACAAGGT tcaatAGTCA	1020
15	atattAGTT ttattGGACT tttaATAGTA tcaaACAAAT ctatGTGTGA ACTAAAAAAT	1080
	tgtattAAAT atttagggta acctgttgcc gttttAGAA taatGTTCT tcttaataca	1140
	cgAAAGCGTA ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcggTTG gctcgCTTta	1200
20	gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagCTTA	1260
	acaAGCCACG ttgcgtGCCA ttGCCAAACA agtCATTtTA acttcacaAG gtccgATTTG	1320
25	acTCCAAAa caacgacaAG ttccGAACA gtcgCGAAGA tcaAGGGTAT aatcgTCTT	1380
	ttgaattcta ttTCTCTTA tttaATAGTC cctctcgtgt gatagtTTT AAAAGATTtT	1440
	tAAAACGTAG ctgctgttta agtAAATCCC agtccTTcAg. tttgtgCTTT tGtGtGTTT	1500
30	gtttctctGA tttacggaat ttggaaataa taagCTT	1537

<210> 45

35 <211> 734

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

40

<220>

45 <221> variation

<222> (1) .. (734)

<223>

50

<400> 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc

60

	cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
5	cagctagtcg ttaaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggatcg	180
	gagctgcttt ttgttcaaatt gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
	caaaaggtaa ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgtttt taggataat	300
10	gatatttaga tagatttagct atcacctgtg ctgtgggtg cagctccaa gggcttacc	360
	gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggaggtg gggattata ggcttttgt	420
15	tgagaatgtt gagaaagagg tttgacaaat cgggtttga atgaggtaa atggagttt	480
	attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggtgatggg gatattaaag acggscata	540
	tagtgatgcc acgtaaaaa aggttaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
20	tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
	ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttgttgc ttgttgtgt tgagagacac tccaatccaa	720
	acagatacaa ggcg	734
25		
	<210> 46	
	<211> 280	
30	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
35		
	<220>	
	<221> variation	
40	<222> (1)...(280)	
	<223>	
45		
	<400> 46	
	gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaaag attaagaggg tgatggggat	60
50	ataaaagacg gccaatrttag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtaaaa acatacaacg	120
	tggctttaaa agatggcttg gctgctaatt aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
	aaattcaatt caattctatt gaatgcaaaag caaagcaaaag caaagggttgc ttgttgttgc	240

280

tggttagagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

5 &lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; DNA

10 &lt;213&gt; Tagetes erecta

15 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; Sense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(358)

20 &lt;223&gt;

25	<400> 47	60
	aagcttacccg atagtaaaat cgttagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag	
	gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaaatc ggtgtttgaa tgaggtaaa	120
30	tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgtatgggg atattaaaga	180
	cggccatat agtgatgcca cgtaaaaaa ggtaagtgaa aacataacaac gtggctttaa	240
	aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat	300
35	tcaattctat tgaatgc当地 gcaaagcaaa gcaaagggttg tttgttgtg ttgtcgac	358

&lt;210&gt; 48

40 &lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

50 &lt;221&gt; Antisense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(361)

&lt;223&gt;

5 <400> 48  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
taggcttgt tggagaatg ttgagaaaga ggttgacaa atcggtgttt gaatgaggtt 120  
10 aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggtgatg gggatattaa 180  
agacggccaa tatagtgtatg ccacgttagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240  
15 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatttatcc attcaaattc 300  
aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttttg ttgttggatc 360  
361  
c

20 <210> 49

<211> 28

25 <212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz .

30 <220>  
<221> Primer

35 <222> (1)..(28)

<223>

40 <400> 49  
gagctcaactc actgatttcc attgcttg 28

45 <210> 50

<211> 37

<212> DNA

50 <213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

5 &lt;222&gt; (1)..(37)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 50

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

15 &lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(34)

30

&lt;223&gt;

35 &lt;400&gt; 51

atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

&lt;210&gt; 52

40

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

50

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(25)

<223>

5 <400> 52 taagctttt gttgaagaga tttgg 25

<210> 53

10 <211> 23

<212> DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

20 <221> Primer

<222> (1), (23)

25 <223>

30 <400> 53 gaaaatactt catcagcatt acc 23

<210> 54

35 <211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

40

<220>

45 <221> Primer

<222> (1) .. (28)

<223>

50

<400> 54  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

5 <211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

10

<220>

15 <221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

20

<400> 55

ggatccgggtg atacctgcac atcaac

26

25

<210> 56

<211> 28

30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

35

<220>

<221> Primer

40

<222> (1)..(28)

<223>

45

<400> 56

aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

50

<210> 57

<211> 29

<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
5  
<220>  
<221> Primer  
10 <222> (1) .. (29)  
<223>  
15  
<400> 57  
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac 29  
20 <210> 58  
<211> 30  
25 <212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
30  
<220>  
<221> Primer  
35 <222> (1) .. (30)  
<223>  
40  
<400> 58  
aggatccaac caaatccagt atacagttac 30  
45 <210> 59  
<211> 28  
50 <212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

5 &lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 59

gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

15 &lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

25 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(25)

30

&lt;223&gt;

35 &lt;400&gt; 60

aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

&lt;210&gt; 61

40

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

50

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(29)

<223>

5 <400> 61 gtcgacagaa aataacttcat cagcattac 29'

<210> 62

10

1212 DNA

## 15 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

20 <221> Primer

<222> (1) .. (29)

25 <223>

30 <400> 62 ggatccagaa aatacttcat cagcattac 29

<210> 63

35 <211> 27

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

40

<220>

45 <221> Primer

<222> (1) .. (27)

<223>

50

<400> 63  
gaattctctt tggatttagca ctgattg

27

<210> 64  
5 <211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
10  
  
<220>  
15 <221> Primer  
<222> (1)..(23)  
  
● 20 <223>  
  
<400> 64 23  
cgccttgtat ctgtttggat tgg  
25  
  
<210> 65  
<211> 24  
30 <212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
  
35  
  
<220>  
● <221> Primer  
40 <222> (1)..(24)  
  
<223>  
  
45  
  
<400> 65 24  
ctaacaatca atgagtatga gagc  
  
50 <210> 66  
<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5

<220>

<221> Primer

10

<222> (1)..(26)

<223>

15

<400> 66

agaggcaaggc cagcaggacc acaacc

26

20

<210> 67

<211> 26

25 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

<221> Primer

35

40

<400> 67  
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

45 <210> 68

<211> 26

<212> DNA

50

#### noch beweisliche Sequenz

<220>

<221> Primer

5 <222> (1)..(26)

<223>

10 <400> 68 26  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

15 <210> 69

<211> 15

● 20 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

30 <223>

35 <400> 69 15  
gtcgagtagtgg gagtt

● 40 <210> 70

<211> 28

<212> DNA

45 <213> kuenstliche Sequenz

50 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

5 <400> 70 aagcttaccc atagtaaaaat cgtttagtt 28

	<210>	71
10	<211>	31

<212> DNA  
15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(3)  
25 <223>

30 <400> 71 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t 31

<210> 72

35 <211> 28

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

<400> 72  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc  
45 28

<210> 73

<211> 28

50 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5 <221> Primer  
<222> (1)..(28)  
  
10 <223>  
  
15 <400> 73 28  
ggatccaaaca acaacaaaaca acctttgc  
  
20 <210> 74  
<211> 28  
<212> DNA  
  
<213> kuenstliche Sequenz  
  
25 <220>  
  
<221> Primer  
30 <222> (1)..(28)  
  
<223>  
  
35 <400> 74 28  
gtcgactttt tggtaagag atttggtg  
  
40 <210> 75  
<211> 28  
  
45 <212> DNA  
  
<213> kuenstliche Sequenz  
  
50 <220>  
<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

5

10

<400> 75 28  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

15 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25 <222> (1)..(22)

<223>

30

<400> 76 22  
gagctctaca aattagggtt ac

35 <210> 77

<211> 23.

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

45 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

50 <223>

<400> 77  
aagcttattat tttccaaatt ccg 23

5 <210> 78  
<211> 50  
<212> DNA  
10 <213> kuenstliche Sequenz

15 <220>  
<221> Primer  
20 <222> (1)..(50)  
<223>

25 <400> 78  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag 50

30 <210> 79  
<211> 1062  
<212> DNA  
35 <213> Haematococcus pluvialis

40 <220>  
<221> CDS  
<222> (32)..(1021)  
45 <223>

50 <400> 79  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta 52  
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val  
1 5

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag 100

	Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu			
	10	15	20	
	aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag			148
5	Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln			
	25	30	35	
	tac tcg ctt ccg tca gag gag tca gac gac ggc gcc cgc ccg gga ctg aag			196
10	Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys			
	40	45	50	55
	aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg			244
	Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala			
	60	65	70	
15	cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt			292
	Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe			
	75	80	85	
20	caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtc			340
	Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val			
	90	95	100	
25	tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac			388
	Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Ser Ser Leu Leu His			
	105	110	115	
30	atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt			436
	Ile Val Val Val Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe			
	120	125	130	135
	atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg			484
	Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg			
	140	145	150	
35	cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg			532
	Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp			
	155	160	165	
40	ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac			580
	Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His			
	170	175	180	
45	act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc			628
	Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly			
	185	190	195	
50	att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tgg atg tgg			676
	Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp			
	200	205	210	215
	cag ttt ggc cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt			724
	Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly			
	220	225	230	

gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg  
 Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu  
 235 240 245

5 tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct 820  
 Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro  
     250                255                260

15 aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc 916  
 Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys  
 280 285 290 295

tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc 964  
Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro  
300 305 310

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
315 320 325

25 cct gcc tag ctggacacac tgcagtggc cctgctgcc a gctgggcatt c 1062  
Pro Ala

30 <210> 80

<211> 329

35 <212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

40 <400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

45

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
                  20                         25                         30

50 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
           35                  40                  45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60

5 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80

10 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
10 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
15 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
20 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
25 130 135 140

25 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

30 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

35 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

35 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

40 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

45 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

50 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275                    280                    285

5

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290                    295                    300

10

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305                    310                    315                    320

15 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

20 <210> 81

<211> 789

<212> DNA

25 <213> Nostoc punctiforme

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(789)

40 <400> 81

tgg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa  
 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1                5                10                15

48

45 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20                25                30

96

50 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35                40                45

144

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa  
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50                55                60

192

	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65	70	75	80	240
5	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85	90		95	288
10	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100	105		110	336
15	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115	120		125	384
20	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130	135		140	432
25	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145	150	155	160	480
30	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165	170		175	528
35	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180	185		190	576
40	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195	200		205	624
45	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210	215		220	672
50	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225	230	235	240	720
	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245	250		255	768
	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260				789

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 262

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

10

&lt;400&gt; 82

Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
1 5 10 15

15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
20 25 30

20

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
35 40 45

25

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
50 55 60

30

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

35

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
85 90 95

40

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
100 105 110

45

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
115 120 125

50

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

55

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
                  180                     185                     190  
**5**  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
                  195                     200                     205  
**10**  
 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
                  210                     215                     220  
**15**  
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
                  225                     230                     235                     240  
**20**  
 val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
                  245                     250                     255  
  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
                  260  
**25**  
 <210> 83  
  
 <211> 762  
**30**  
 <212> DNA  
  
 <213> *Nostoc punctiforme*  
  
**35**  
 <220>  
  
 <221> CDS  
**40**  
 <222> (1)...(7,62)  
  
 <223>  
  
**45**  
 <400> 83  
 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca  
 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro      48  
**50**    1             5                     10                     15  
  
 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val      96  
                  20                     25                     30

	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45	144
5	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60	192
10	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
15	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 85 90 95	288
20	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys 100 105 110	336
25	aaa cat tgg tta cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp 115 120 125	384
30	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe 130 135 140	432
35	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile 145 150 155 160	480
40	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr 165 170 175	528
45	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
50	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln 195 200 205	624
	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile 210 215 220	672
	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag	762

92

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

5 <210> 84  
<211> 253  
<212> PRT  
10 <213> Nostoc punctiforme

15 <400> 84  
Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
1 5 10 15

20 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
20 25 30

25 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
35 40 45

30 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
50 55 60

35 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

40 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
85 90 95

45 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
100 105 110

50 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
115 120 125

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

5

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

10

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

15 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

20 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

25

<210> 85

30

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

35

<220>

40

<221> CDS

<222> (1) .. (804)

<223>

45

<400> 85

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 50 1 5 10 15

48

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

96

	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
35	35 40	45
5		
	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
	Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
	50 55 60	
10		
	ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240
	Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu	
	65 70 75 80	
15		
	ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat	288
	Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	
	85 90 95	
20		
	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca	336
	Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	
	100 105 110	
	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg	384
	Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	
	115 120 125	
25		
	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac	432
	Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	
	130 135 140	
30		
	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg	480
	Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	
	145 150 155 160	
35		
	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc	528
	Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Leu	
	165 170 175	
40		
	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc	576
	Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Phe Ser	
	180 185 190	
	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc	624
	Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	
	195 200 205	
45		
	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg	672
	Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	
	210 215 220	
50		
	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac	720
	Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	
	225 230 235 240	
	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt	768

95

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 . 250 255

5 cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga 804  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

10 <210> 86  
<211> 267  
<212> PRT  
15 <213> *Synechococcus* WH8102

20 <400> 86  
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
1 5 10 15

25 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
20 25 30

30 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
           35                  40                  45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
65 70 75 80

40 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
85 90 95

45 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
                  100              105                  110

50 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
                   115                 120                         125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
145 150 155 160

5

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
165 170 175

10

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
180 185 190

15 val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
195 200 205

● 20 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
210 215 220

25 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
225 230 235 240

25

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
245 250 255

30

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
260 265

35 <210> 87

● <211> 33

<212> DNA

40

<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<221> primer\_bind

50

<222> (1) .. (33)

<223>

<400> 87	33
gcatgctcta gacccataaa agatattttg tga	
 5 <210> 88	
<211> 33	
<212> DNA	
10 <213> Künstliche Sequenz	
 15 <220>	
<221> primer_bind	
● 20 <222> (1)..(33)	
<223>	
 25 <400> 88	33
gcatgcatac agaaatggtt cagtgtcaac cat	
 30 <210> 89	
<211> 805	
<212> DNA	
35 <213> Nostoc sp. Strain PCC7120	
 ● 40 <220>	
<221> variation	
<222> (1)..(805)	
45 <223>	
 50 <400> 89	60
gcatgcatac agaaatggtt cagtgtcaac catcatctc gcattcagaa aaactgggtgt	
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggtatattt attgcctgct	120
tatatatttattt tttatggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa	180

ttcataagag cttatttagt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240  
5 ttattactgc tcatagtatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaaata 300  
attttatagg taagctcaact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360  
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420  
10 gtcatccccca aaacttcttt ctttggtatac tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480  
cgcaaatttt cggtttagtg atgattttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540  
15 aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt 600  
attttggtac attttgcct cataaaaagc tagaaggtgg ttatactaac ccccatgtg 660  
cgcgcagttat cccattacct cttttttgtt cttttgttac ttgttatcac ttccggctacc 720  
20 acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtgaa attacctgaa gctcacaaaa 780  
tatctttata aggtcttagag catgc 805  
  
25 <210> 90  
  
<211> 35  
  
<212> DNA  
30 <213> Künstliche Sequenz  
  
  
35 <220>  
  
<221> primer\_bind  
  
<222> (1)..(35)  
40 <223>  
  
  
45 <400> 90  
gagctcttca ttatattcgat tttgatttcg tgacc 35  
  
50 <210> 91  
<211> 44  
  
<212> DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> primer\_bind

10 <222> (1)..(44)

10 <223>

15 <400> 91 aagcttgagc tcgggttgcata agaagaagaa gaagaagatg aact 44

● 20 <210> 92

<211> 653

<212> DNA

25 <213> Arabidopsis thaliana

30 <220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

35 <223>

● 40 <400> 92 gagctttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ctttgttg 60

taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggcttt gagcttttg tagttgaatt 120

tctctggctg atctttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat 180

45 ttgagcttct tttgaactat ttctgttaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240

actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaataga 300

50 tgtcataaga gccccatcaa taagtgcctg agcccattag cttagccagt aactaccaga 360

tttgtgagatg gatgtgtgaa cagtttttt tttgatgttag gactgaaatg tgaacaacag 420

gcgcatgaaa ggctaaatata ggacaatgat aagcagaaaat aacttatcct ctctaacact 480

100

5	tggcctcaca ttgccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatata	540
	tcccgcta at cttttttct ttgatcttt ttttttgct tattat tttt ttgactttga	600
	tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt	653

10 &lt;210&gt; 93

10 &lt;211&gt; 28

10 &lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

20 &lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; primer\_bind

20 &lt;222&gt; (1)..(28)

25 &lt;223&gt;

30	<400> 93 gagctcactc actgatttcc attgcttg	28
----	--	----

35 &lt;210&gt; 94

35 &lt;211&gt; 30

35 &lt;212&gt; DNA

35 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

40

45 &lt;220&gt;

45 &lt;221&gt; primer\_bind

45 &lt;222&gt; (1)..(30)

45 &lt;223&gt;

50

50	<400> 94 aagcttgagc tctttgttga agagatttgg	30
----	--	----

<210> 95  
5 <211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
10  
  
<220>  
15 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(37)  
  
<223>  
20  
  
<400> 95  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc  
25  
37  
  
<210> 96  
<211> 34  
30 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
35  
  
<220>  
40 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
  
<223>  
45  
  
<400> 96  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac  
50  
34  
<210> 97  
<211> 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CDS

10 &lt;222&gt; (1)..(831)

&lt;223&gt;

15

<400> 97  
 atg cca tcc gag tcg tca gac gca gct cgt cct gtg ttg aag cac gcc 48  
 Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
 1 5 10 15

● 20 tat aaa cct cca gca tct gac gcc aag ggc atc act atg gcg ctg acc 96  
 Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 20 25 30

25 atc att ggc acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttc caa atc 144  
 Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 35 40 45

30 agg cta ccg aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa 192  
 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 50 55 60

● 35 gcc aca gcc cag ctg ttg ggc gga agc agc agc cta ttg cac atc gcc 240  
 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 65 70 75 80

● 40 gca gtc ttc att gta ctt gag ttt ctg tac act ggt cta ttc atc acc 288  
 Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
 85 90 95

45 acg cat gat gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg aac agg cag ctc 336  
 Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
 100 105 110

50 aat gat ctc ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac 384  
 Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
 115 120 125

50 tac agc atg cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg aaa 432  
 Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
 130 135 140

gac cct gac ttc cac aaa gga aat cct ggc ctt gtc ccc tgg ttc gcc 480

## 103

	Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala			
145	150	155	160	
	agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg gca		528	
5	Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala			
	165	170	175	
	tgg tgg gca gtg gtg atg caa acg ttg ggg gcc ccc atg gcg aat ctc		576	
	Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu			
10	180	185	190	
	cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc ttc		624	
	Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe			
	195	200	205	
15	tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca gca		672	
	Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala			
	210	215	220	
20	ggc tct cag gtc atg tct tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca tct		720	
	Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser			
	225	230	235	240
25	gat gtg atg agc ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg ttt gcc ccc		768	
	Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro			
	245	250	255	
	tgg tgg cag ctg ccc cac tgc cgc cgc ctg tct ggg cgt ggc ctg gtg		816	
	Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val			
30	260	265	270	
	cct gcc ttg gca tga		831	
	Pro Ala Leu Ala			
	275			
35	<210> 98			
	<211> 276			
40	<212> PRT			
	<213> Haematococcus pluvialis			
45	<400> 98			
	Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala			
50	1	5	10	15
	Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr			
	20	25	30	

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
35 40 45

5

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
50 55 60

10

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
65 70 75 80

15 Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
85 90 95

20

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
100 105 110

25

Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
130 135 140

30

Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala  
145 150 155 160

35

Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala  
165 170 175

40

Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu  
180 185 190

Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe  
195 200 205

45

Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala  
210 215 220

50

Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser  
225 230 235 240

105

Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro		
245	250	255

5 Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val		
260	265	270

10 Pro Ala Leu Ala		
	275	

&lt;210&gt; 99

15 &lt;211&gt; 729

&lt;212&gt; DNA

20	<213> Paracoccus sp. MBIC1143	

&lt;220&gt;

25 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(729)

30	<223>	

&lt;400&gt; 99

35 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	48
1 5 10 15	

40 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat Ile Val Ser Gly Gly Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	96
20 25 30	

45 gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	144
35 40 45	

50 aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc atc Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	192
50 55 60	

55 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	240
65 70 75 80	

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg	288
---	-----

## 106

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

5 cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

10 gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384  
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

15 cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc 432  
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

20 ● gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac 480  
 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

25 ● gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc 528  
 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

30 ● gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg 576  
 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

35 ● gac cgc cac aat gcg ccg tcg ccg atc agc gac ccc gtg tcg ctg 624  
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

40 ● ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672  
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

45 ● ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

50 ● 40 acc gca tga 729  
 Thr Ala

45 <210> 100

<211> 242

<212> PRT

50 <213> Paracoccus sp. MBIC1143

PF 54148

107

<400> 100

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

5

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

10

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
35 40 45

15

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

20

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

25

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

25

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

30

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

35

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

40

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

45

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

50

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

5 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

10

<210> 101

15 <211> 735

<212> DNA

20 <213> Brevundimonas aurantiaca

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(735)

30 <223>

<400> 101

atg acc gcc gcc gtc gcc gag cca cgc acc gtc ccg cgc cag acc tgg	48
35 Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp	
1 5 10 15	

atc ggt ctg acc ctg gcg gga atg atc gtg gcg gga tgg gcg gtt ctg	96
40 Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu	
20 25 30	

cat gtc tac ggc gtc tat ttt cac cga tgg ggg ccg ttg acc ctg gtg	144
45 His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val	
35 40 45	

atc gcc ccg gcg atc gtg gcg gtc cag acc tgg ttg tcg gtc ggc ctt	192
45 Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu	
50 55 60	

50 ttc atc gtc gcc cat gac gcc atg tac ggc tcc ctg gcg ccg gga cgg	240
Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg	
65 70 75 80	

ccg cgg ctg aac gcc gca gtc ggc cgg ctg acc ctg ggg ctc tat gcg	288
---	-----

## 109

Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg	Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala		
85	90	95	
ggc ttc cgc ttc gat cggtcg aag acg gcg cac cac gcc cac cac gcc			336
5	Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala		
	100	105	110
gcg ccc ggc acg gcc gac gac ccg gat ttt cac gcc ccg gcg ccc cgc			384
10	Ala Pro Gly Thr Ala Asp Asp Pro Asp Phe His Ala Pro Ala Pro Arg		
	115	120	125
gcc ttc ctt ccc tgg ttc ctg aac ttc ttt cgc acc tat ttc ggc tgg			432
	Ala Phe Leu Pro Trp Phe Leu Asn Phe Phe Arg Thr Tyr Phe Gly Trp		
	130	135	140
15	cgc gag atg gcg gtc ctg acc gcc ctg gtc ctg atc gcc ctc ttc ggc		480
	Arg Glu Met Ala Val Leu Thr Ala Leu Val Leu Ile Ala Leu Phe Gly		
	145	150	155
20	ctg ggg gcg cgg gcc aat ctc ctg acc ttc tgg gcc gcg ccg gcc		528
	Leu Gly Ala Arg Pro Ala Asn Leu Leu Thr Phe Trp Ala Ala Pro Ala		
	165	170	175
25	ctg ctt tca gcg ctt cag ctc ttc acc ttc ggc acc tgg ctg ccg cac		576
	Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Thr Trp Leu Pro His		
	180	185	190
30	cgc cac acc gac cag ccg ttc gcc gac gcg cac cac gcc cgc agc agc		624
	Arg His Thr Asp Gln Pro Phe Ala Asp Ala His His Ala Arg Ser Ser		
	195	200	205
35	ggc tac ggc ccc gtg ctt tcc ctg ctc acc tgt ttc cac ttc ggc cgc		672
	Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg		
	210	215	220
40	cac cac gaa cac cat ctg agc ccc tgg cgg ccc tgg tgg cgt ctg tgg		720
	His His Glu His His Leu Ser Pro Trp Arg Pro Trp Trp Arg Leu Trp		
	225	230	235
45	<210> 102		
	<211> 244		
	<212> PRT		
50	<213> Brevundimonas aurantiaca		

PF 54148

110

<400> 102

Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp  
1 5 10 15

5

Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu  
20 25 30

10

His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val  
35 40 45

15

Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu  
50 55 60

20

Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg  
65 70 75 80

25

Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala  
85 90 95

30

Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala  
100 105 110

Ala Pro Gly Thr Ala Asp Asp Pro Asp Phe His Ala Pro Ala Pro Arg  
115 120 125

35

Ala Phe Leu Pro Trp Phe Leu Asn Phe Phe Arg Thr Tyr Phe Gly Trp  
130 135 140

40

Arg Glu Met Ala Val Leu Thr Ala Leu Val Leu Ile Ala Leu Phe Gly  
145 150 155 160

45

Leu Gly Ala Arg Pro Ala Asn Leu Leu Thr Phe Trp Ala Ala Pro Ala  
165 170 175

50

Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Thr Trp Leu Pro His  
180 185 190

Arg His Thr Asp Gln Pro Phe Ala Asp Ala His His Ala Arg Ser Ser  
195 200 205

111

Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg  
 210 215 220

Arg Gly Glu Ser

10

<210> 103

15 <211> 690

<212> DNA

<213> Nodularia spumigena NSOR10

20

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(690)

<223>

<400> 103 48  
 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 35 1 5 10 15  
 1

96

ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc  
Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
20 25 30

45 gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat  
          Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
                              50                       55                       60

50 ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa  
 Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80  
 aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa 288

## 112

Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Glu		
					85			90				95					
5	aca	gat	cca	gat	ttt	cac	aac	ggg	aag	cag	aaa	aac	ttt	ttt	gct	tgg	336
	Thr	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asn	Gly	Lys	Gln	Lys	Asn	Phe	Phe	Ala	Trp	
					100				105				110				
10	tat	tta	tat	ttt	atg	aag	cgt	tac	tgg	agt	tgg	tta	caa	att	atc	aca	384
	Tyr	Leu	Tyr	Phe	Met	Lys	Arg	Tyr	Trp	Ser	Trp	Leu	Gln	Ile	Ile	Thr	
					115			120				125					
15	tta	atg	att	att	tat	aac	tta	cta	aaa	tat	ata	tgg	cat	ttt	cca	gag	432
	Leu	Met	Ile	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Trp	His	Phe	Pro	Glu	
					130			135				140					
20	gat	aat	atg	act	tat	ttt	tgg	gta	gtt	ccc	tca	att	tta	agt	tct	tta	480
	Asp	Asn	Met	Thr	Tyr	Phe	Trp	Val	Val	Pro	Ser	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	
					145			150			155		160				
25	caa	tta	ttt	tat	ttt	gga	act	ttt	cta	ccc	cac	agt	gag	cct	gta	gaa	528
	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Val	Glu	
					165			170			175						
30	ggt	tat	aaa	gag	cct	cat	cgt	tcc	caa	act	att	agc	cgt	ccc	att	tgg	576
	Gly	Tyr	Lys	Glu	Pro	His	Arg	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	
					180			185			190						
35	tgg	tca	ttt	ata	act	tgt	tac	cat	ttt	ggt	tat	cat	tac	gaa	cat	cat	624
	Trp	Ser	Phe	Ile	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Tyr	Glu	His	His	
					195			200			205						
40	gaa	tac	ccc	cat	gtt	cct	tgg	tgg	caa	tta	cca	gaa	att	tat	aaa	atg	672
	Glu	Tyr	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Met	
					210			215			220						
45	tct	aaa	tca	aat	ttg	tga											690
	Ser	Lys	Ser	Asn	Leu												
					225												
50	<210>	104															
	<211>	229															
	<212>	PRT															
	<213>	Nodularia spumigena NSOR10															
	Met	Ala	Ile	Ala	Ile	Ile	Ser	Ile	Trp	Ala	Ile	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	
	1					5				10			15				

Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
20 25 30

5

Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
35 40 45

10

Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
50 55 60

15

Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
65 70 75 80

20

Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
85 90 95

25

Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
100 105 110

Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
115 120 125

30

Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
130 135 140

35

Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
145 150 155 160

40

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
165 170 175

45

Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
180 185 190

Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
195 200 205

50

Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
210 215 220

Ser Lys Ser Asn Leu  
225

5 <210> 105  
  <211> 1536  
10 <212> DNA  
  <213> Deinococcus radiodurans R1

15 <220>  
20 <221> CDS  
<222> (1)..(1536)  
<223>

25	<400> 105		48
	atg ccg gat tac gac ctg atc gtc atg ggc gcg ggc cac aac gcg ctg Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu		
	1 5 10 15		
30	gtg act gct gcc tac gcc gcc cg 9 ggc ctg aaa gtc ggc gtg ttc Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe		96
	20 25 30		
35	gag cgg cgg cac ctc gtc ggc ggg gcg gtc agc acc gag gag gtc gtg Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val		144
	35 40 45		
40	ccc ggt tac cgc ttc gac tac ggc ggc agc gcc cac atc ctg att cgg Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg		192
	50 55 60		
45	atg acg ccc atc gtg cgc gaa ctc gaa ctc acg cgg cac ggg ctg cat Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His		240
	65 70 75 80		
50	tac ctc gaa gtg gac cct atg ttt cac gct tcc gac ggt gaa acg ccc Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro		288
	85 90 95		
55	tgg ttc att cac cgc gac gcc ggg cgg acc atc cgc gaa ctg gac gaa Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu		336
	100 105 110		
60	aag ttt ccc ggg cag ggc gac gcc tac ggg cgc ttt ctc gac gat tgg		384

## 115

Lys	Phe	Pro	Gly	Gln	Gly	Asp	Ala	Tyr	Gly	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Trp		
115																	
																125	
5	aca	ccc	tcc	gct	cgc	gcc	gtc	gcc	gac	ctg	tcc	aac	tcg	gct	ccg	ggg	432
	Thr	Pro	Phe	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Phe	Asn	Ser	Ala	Pro	Gly	
	130						135					140					
10	ccg	ctc	gac	ctg	ggc	aaa	atg	gtc	atg	cgc	agc	ggc	cag	ggc	aag	gac	480
	Pro	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Met	Val	Met	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Lys	Asp	
	145						150					155				160	
15	tgg	aac	gag	cag	ctc	ccg	cgc	atc	ctg	cg	ccc	tac	ggc	gac	gtg	gct	528
	Trp	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Arg	Pro	Tyr	Gly	Asp	Val	Ala	
	165						170					175					
20	cgc	gag	tac	ttc	agc	gag	gag	cgc	gtg	cg	gct	ccc	ctg	acc	tgg	atg	576
	Arg	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Leu	Thr	Trp	Met	
	180						185					190					
25	gct	gcc	cag	agc	ggc	ccc	cca	ccc	tcg	gac	ccg	ctg	agc	gct	ccc	ttt	624
	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Phe	
	195						200					205					
30	ttg	ctg	tgg	cac	ccg	ctc	tac	cac	gaa	ggc	ggc	gtg	gct	cg	ccc	aaa	672
	Leu	Leu	Trp	His	Pro	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Lys	
	210						215					220					
35	ggc	ggc	agc	ggc	ggc	ctg	acc	aaa	gcc	ctg	cgc	cg	gcc	acc	gag	gcc	720
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	
	225						230					235				240	
40	gaa	ggc	ggc	gag	gtc	tcc	acc	gac	gct	ccg	gtc	aag	gaa	att	ctg	gtc	768
	Glu	Gly	Glu	Val	Phe	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Lys	Glu	Ile	Leu	Val		
	245						250					255					
45	aag	gac	ggc	aag	gct	cag	ggc	atc	cg	ctg	gaa	agc	ggc	gag	acg	tac	816
	Lys	Asp	Gly	Lys	Ala	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Thr	Tyr	
	260						265					270					
50	acc	gcc	cgc	gcc	gtc	gtc	tcg	ggc	gtc	cac	atc	ctg	acc	act	gct	aat	864
	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Gly	Val	His	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Asn	
	275						280					285					
55	gcc	ctg	ccc	gcc	gaa	tat	gtc	cct	agc	gcc	agg	aat	gtg	cgc	gtc		912
	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Tyr	Val	Pro	Ser	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Arg	Val	
	290						295					300					
60	ggc	aac	ggc	ttc	ggc	atg	att	ttg	cgc	ctc	gcc	ctc	agt	gaa	aaa	gtc	960
	Gly	Asn	Gly	Phe	Gly	Met	Ile	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	
	305						310					315				320	
65	aaa	tac	cgt	cac	cac	acc	gag	ccc	gac	tca	cgc	atc	ggc	ctg	gga	ttg	1008
	Lys	Tyr	Arg	His	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	
	325						330					335					

	ctg atc aaa aac gag cg <sup>g</sup> caa atc atg cag ggc tac ggc gaa tac ctc Leu Ile Lys Asn Glu Arg Gln Ile Met Gln Gly Tyr Gly Glu Tyr Leu 340 345 350	1056
5	gcc ggg cag ccc acc acc gac ccg ccc ctc gtc gcc atg agc ttc agc Ala Gly Gln Pro Thr Thr Asp Pro Pro Leu Val Ala Met Ser Phe Ser 355 360 365	1104
10	g <sup>c</sup> gtg gac gac tcg ctc gcc cca ccg aac ggc gac gtg ttg tgg ctg Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu 370 375 380	1152
15	tgg g <sup>c</sup> g cag tac tac ccc ttc gag ctc gcc acc ggg agc tgg gaa acg Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr 385 390 395 400	1200
20	cg <sup>c</sup> acc gcc gaa gc <sup>g</sup> cgg gag aac atc ctg cgg gcc ttt gag cac tac Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr 405 410 415	1248
	gc <sup>g</sup> ccg ggc acc cg <sup>c</sup> gac acg att gtg ggc gaa ctc gtg cag acg ccg Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro 420 425 430	1296
25	cag tgg ctg gaa acc aac ctc ggc ctg cac cgg ggc aac gtg atg cac Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His 435 440 445	1344
30	ctg gaa atg tcc ttc gac cag atg ttc tcc ttc cgc ccc tgg ctg aaa Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys 450 455 460	1392
35	gc <sup>g</sup> agc cag tac cg <sup>c</sup> tgg ccg ggc gtg cag ggg ctg tac ctc acc ggc Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly 465 470 475 480	1440
40	gc <sup>c</sup> agc acc cac ccc ggc gga ggc atc atg ggc gcc tcg gga cg <sup>g</sup> aac Ala Ser Thr His Pro Gly Gly Ile Met Gly Ala Ser Gly Arg Asn 485 490 495	1488
	gc <sup>g</sup> gc <sup>g</sup> cgg gtc atc gtg aag gac ctg acg cgg agg cg <sup>c</sup> tgg aaa tga Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys 500 505 510	1536
45	<210> 106	
	<211> 511	
50	<212> PRT	
	<213> Deinococcus radiodurans R1	

&lt;400&gt; 106

5    Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
     1                         5                         10                         15  
  
 10    Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
       20                         25                         30  
  
 15    Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
       35                         40                         45  
  
 20    Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
       50                         55                         60  
  
 25    Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
       65                         70                         75                         80  
  
 30    Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
       85                         90                         95  
  
 35    Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
       100                         105                         110  
  
 40    Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
       115                         120                         125  
  
 45    Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly  
       130                         135                         140  
  
 50    Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp  
       145                         150                         155                         160  
  
 45    Trp Asn Glu Gln Leu Pro Arg Ile Leu Arg Pro Tyr Gly Asp Val Ala  
       165                         170                         175  
  
 50    Arg Glu Tyr Phe Ser Glu Glu Arg Val Arg Ala Pro Leu Thr Trp Met  
       180                         185                         190  
  
 45    Ala Ala Gln Ser Gly Pro Pro Pro Ser Asp Pro Leu Ser Ala Pro Phe  
       195                         200                         205

Leu Leu Trp His Pro Leu Tyr His Glu Gly Gly Val Ala Arg Pro Lys  
210 215 220

5

Gly Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ala Thr Glu Ala  
225 230 235 240

10

Glu Gly Gly Val Phe Thr Asp Ala Pro Val Lys Glu Ile Leu Val  
245 250 255

15

Lys Asp Gly Lys Ala Gln Gly Ile Arg Leu Glu Ser Gly Glu Thr Tyr  
260 265 270

20

Thr Ala Arg Ala Val Val Ser Gly Val His Ile Leu Thr Thr Ala Asn  
275 280 285

25

Ala Leu Pro Ala Glu Tyr Val Pro Ser Ala Ala Arg Asn Val Arg Val  
290 295 300

30

Gly Asn Gly Phe Gly Met Ile Leu Arg Leu Ala Leu Ser Glu Lys Val  
305 310 315 320

35

Lys Tyr Arg His His Thr Glu Pro Asp Ser Arg Ile Gly Leu Gly Leu  
325 330 335

40

Leu Ile Lys Asn Glu Arg Gln Ile Met Gln Gly Tyr Gly Glu Tyr Leu  
340 345 350

Ala Gly Gln Pro Thr Thr Asp Pro Pro Leu Val Ala Met Ser Phe Ser  
355 360 365

45

Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu  
370 375 380

Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr  
385 390 395 400

50

Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr  
405 410 415

119

Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro  
 420 425 430

5 Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His  
 435 440 445

10 Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys  
 450 455 460

15 Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly  
 465 470 475 480

20 Ala Ser Thr His Pro Gly Gly Ile Met Gly Ala Ser Gly Arg Asn  
 485 490 495

25 Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys  
 500 505 510

25 <210> 107

<211> 1666

<212> DNA

30

<213> *Lycopersicon esculentum*

35 <220>

<221> CDS

40

<222> (1)..(1494)

<223>

45 <400> 107 48  
 atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct  
 Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

50 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96  
 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aac agt agt 144

## 120

	Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser				
	35	40	45		
	aaa ctt ttt tgt agc ttt ctt gat tta gca ccc aca tca aag cca gag			192	
5	Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu	55	60		
	tct tta gat gtt aac atc tca tgg gtt gat cct aat tcg aat cgg gct			240	
10	Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala	70	75	80	
	caa ttc gac gtg atc att atc gga gct ggc cct gct ggg ctc agg cta			288	
	Gln Phe Asp Val Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu	85	90	95	
15	gct gaa caa gtt tct aaa tat ggt att aag gta tgt tgt gtt gac cct			336	
	Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro	100	105	110	
20	tca cca ctc tcc atg tgg cca aat aat tat ggt gtt tgg gtt gat gag	115	120	125	384
	Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu				
25	ttt gag aat tta gga ctg gaa aat tgt tta gat cat aaa tgg cct atg	130	135	140	432
	Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met				
30	act tgt gtg cat ata aat gat aac aaa act aag tat ttg gga aga cca	145	150	155	480
	Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro				
	tat ggt aga gtt agt aga aag aag ctg aag ttg aaa ttg ttg aat agt	165	170	175	528
	Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Asn Ser				
35	tgt gtt gag aac aga gtg aag ttt tat aaa gct aag gtt tgg aaa gtg	180	185	190	576
	Cys Val Glu Asn Arg Val Lys Phe Tyr Lys Ala Lys Val Trp Lys Val				
40	gaa cat gaa gaa ttt gag tct tca att gtt tgt gat gat ggt aag aag	195	200	205	624
	Glu His Glu Glu Phe Glu Ser Ser Ile Val Cys Asp Asp Gly Lys Lys				
45	ata aga ggt agt ttg gtg gat gca agt ggt ttt gct agt gat tt	210	215	220	672
	Ile Arg Gly Ser Leu Val Val Asp Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asp Phe				
50	ata gag tat gac agg cca aga aac cat ggt tat caa att gct cat ggg	225	230	235	720
	Ile Glu Tyr Asp Arg Pro Arg Asn His Gly Tyr Gln Ile Ala His Gly				
	gtt tta gta gaa gtt gat aat cat cca ttt gat ttg gat aaa atg gtg	245	250	255	768
	Val Leu Val Glu Val Asp Asn His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val				

	ctt atg gat tgg agg gat tct cat ttg ggt aat gag cca tat tta agg	816
	Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg	
	260 265 270	
5	gtg aat aat gct aaa gaa cca aca ttc ttg tat gca atg cca ttt gat	864
	Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp	
	275 280 285	
10	aga gat ttg gtt ttc ttg gaa gag act tct ttg gtg agt cgt cct gtt	912
	Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val	
	290 295 300	
15	tta tcg tat atg gaa gta aaa aga agg atg gtg gca aga tta agg cat	960
	Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His	
	305 310 315 320	
20	ttg ggg atc aaa gtg aaa agt gtt att gag gaa gag aaa tgt gtg atc	1008
	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Lys Cys Val Ile	
	325 330 335	
25	cct atg gga gga cca ctt ccg cg att cct caa aat gtt atg gct att	1056
	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile	
	340 345 350	
	ggt ggg aat tca ggg ata gtt cat cca tca aca ggg tac atg gtg gct	1104
	Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355 360 365	
30	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg	1152
	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
	370 375 380	
35	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt	1200
	Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val	
	385 390 395 400	
40	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat	1248
	Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr	
	405 410 415	
	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg	1296
	Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg	
	420 425 430	
45	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg	1344
	Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly	
	435 440 445	
50	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg	1392
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu	
	450 455 460	
	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440

PF 54148

122

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
465 470 475 480

aaa tgt cct ctt cct ttg gtt aga ctg att ggc aat cta gca ata gag 1488  
5 Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
485 490 495

agc ctt tgaatgtgaa aagtttgaat cattttcttc attttaattt ctttgattat 1544  
Ser Leu

10

tttcataattt tctcaattgc aaaagtgaga taagagctac atactgtcaa caaataaaact 1604

15

actattggaa agttaaaata tgtgtttgtt gtatgttatt ctaatggaat ggattttgta 1664  
aa 1666

● <210> 108

20

<211> 498

<212> PRT

25

<213> Lycopersicon esculentum

30

<400> 108  
Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
1 5 10 15

35

Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
20 25 30

40

● Thr Thr Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
35 40 45

45

Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
50 55 60

Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
65 70 75 80

50

Gln Phe Asp Val Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
85 90 95

123

Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
100 105 110

5 Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
115 120 125

10 Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
130 135 140

15 Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
145 150 155 160

Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Asn Ser  
165 170 175

20 Cys Val Glu Asn Arg Val Lys Phe Tyr Lys Ala Lys Val Trp Lys Val  
180 185 190

25 Glu His Glu Glu Phe Glu Ser Ser Ile Val Cys Asp Asp Gly Lys Lys  
195 200 205

30 Ile Arg Gly Ser Leu Val Val Asp Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asp Phe  
210 215 220

35 Ile Glu Tyr Asp Arg Pro Arg Asn His Gly Tyr Gln Ile Ala His Gly  
225 230 235 240

Val Leu Val Glu Val Asp Asn His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val  
245 250 255

40 Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg  
260 265 270

45 Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp  
275 280 285

50 Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val  
290 295 300

Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His  
305 310 315 320

Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile  
325 330 335

5

Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile  
340 345 350

10

Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala  
355 360 365

15

Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly  
370 375 380

20

Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val  
385 390 395 400

Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr  
405 410 415

25

Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg  
420 425 430

30

Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly  
435 440 445

35

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu  
450 455 460

40

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
465 470 475 480

Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
485 490 495

45

Ser Leu

50

<210> 109

<211> 1125

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20) .. (946)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 109

ttggtcatct ccacaatca atg gct gcc gcc gcc aga atc tcc gcc tcc tct	52
Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser	
1 5 10	

20

acc tca cga act ttt tat ttc cgt cat tca ccg ttt ctt ggc cca aaa	100
Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys	
15 20 25	

25

cct act tcg aca acc tca cat gtt tct cca atc tct cct ttt tct ctt	148
Pro Thr Ser Thr Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu	
30 35 40	

30

aat cta ggc cca att ttg agg tct aga aga aaa ccc agt ttc act gtt	196
Asn Leu Gly Pro Ile Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val	
45 50 55	

35

tgc ttt gtt ctc gag gat gag aag ctg aaa cct caa ttt gac gat gag	244
Cys Phe Val Leu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu	
60 65 70 75	

40

gct gag gat ttt gaa aag aag att gag gaa cag atc tta gct act cgc	292
Ala Glu Asp Phe Glu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg	
80 85 90	

45

ttg gcg gag aaa ctg gct agg aag aaa tcg gag agg ttt act tat ctt	340
Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu	
95 100 105	

50

gtg gct gct ata atg tct agt ttt ggg att act tct atg gct gtt atg	388
Val Ala Ala Ile Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met	
110 115 120	

55

gct gtt tat tac aga ttt tcg tgg caa atg gag gga gga gaa gtt cct	436
Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro	
125 130 135	

gta acc gaa atg ttg ggt aca ttt gct ctc tct gtt ggt gct gta	484
---	-----

## PF 54148

126

	Val Thr Glu Met Leu Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val			
140	145	150	155	
	gga atg gag ttt tgg gcg aga tgg gca cac aaa gca ctg tgg cat gct		532	
5	Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala			
	160	165	170	
	tca cta tgg cac atg cat gag tca cac cac aaa cca aga gaa gga cct		580	
	Ser Leu Trp His Met His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro			
10	175	180	185	
	ttt gag ctg aac gac gtt ttc gcc ata aca aac gct gtt cca gca ata		628	
	Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile			
	190	195	200	
15	gcc ctc ctc aac tat ggt ttc ttc cat aaa ggc ctc att gcc gga cta		676	
	Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu			
	205	210	215	
20	tgc ttc ggt gct ggg cta ggg atc aca gta ttt gga atg gca tac atg		724	
	Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met			
	220	225	230	235
25	ttt gtt cac gat ggt ttg gtt cac aag aga ttc cca gtt gga cct gta		772	
	Phe Val His Asp Gly Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val			
	240	245	250	
30	gcc aat gta cct tat ctt agg aag gtg gct gct cat tcg ctt cat		820	
	Ala Asn Val Pro Tyr Leu Arg Lys Val Ala Ala His Ser Leu His			
	255	260	265	
	cac tca gag aag ttc aat ggt gtc cca tat ggc ttg ttc ttc gga cct		868	
	His Ser Glu Lys Phe Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro			
	270	275	280	
35	aag gaa ctg gaa gaa gta gga ggg acg gaa gag ttg gaa aag gaa gtg		916	
	Lys Glu Leu Glu Glu Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val			
	285	290	295	
40	ata cga agg acg aga ctt tcg aaa gga tca tgaacgattt ttcataaaaca		966	
	Ile Arg Arg Thr Arg Leu Ser Lys Gly Ser			
	300	305		
45	tagaatgtca ttttacactt ctttatcaatg aggaagggtg attttgatg tatttgatag		1026	
	tagagaaaaa tgttagcttc ttgatgaaat gaatttgtat ttatgttaggc tcttcttatt		1086	
	cagtaagatt ttttcttttt tttgatctcg tgccgaatt		1125	
50	<210> 110			
	<211> 309			

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;400&gt; 110

Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser Thr Ser Arg Thr Phe  
10 1 5 10 15

Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys Pro Thr Ser Thr Thr  
20 25 30

15

Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu Asn Leu Gly Pro Ile  
35 40 45

20

Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu  
50 55 60

25 Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu Ala Glu Asp Phe Glu  
65 70 75 80

30 Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Lys Leu  
85 90 95

35 Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Ile Met  
100 105 110

— Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg  
115 120 125

40 Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Val Thr Glu Met Leu  
130 135 140

45 Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp  
145 150 155 160

50 Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met  
165 170 175

His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp  
180 185 190

Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Asn Tyr  
195 200 205

5

Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly  
210 215 220

10

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly  
225 230 235 240

15

Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val Ala Asn Val Pro Tyr  
245 250 255

20

Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His His Ser Glu Lys Phe  
260 265 270

25

Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu  
275 280 285

Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Thr Arg  
290 295 300

30

Leu Ser Lys Gly Ser  
305

35

<210> 111

<211> 1779

<212> DNA

40

<213> Arabidopsis thaliana

45

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1779)

50

<223>

<400>	111		48
atg gat ctc cgt cgg agg cct cct aaa cca ccg gtt acc aac aac aac			
Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn			
1	5	10	15
aac tcc aac gga tct ttc cgt tct tat cag cct cgc act tcc gat gac			96
Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp			
20	25	30	
gat cat cgt cgc cgg gct aca aca att gct cct cca ccg aaa gca tcc			144
Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser			
35	40	45	
gac gcg ctt cct ctt ccg tta tat ctc aca aac gcc gtt ttc ttc acg			192
Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr			
50	55	60	
ctc ttc tcc gtc gcg tat tac ctc ctc cac ccg tgg cgt gac aag			240
Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys			
65	70	75	80
atc cgt tac aat acg cct ctt cac gtc gtc act atc aca gaa ctc ggc			288
Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly			
85	90	95	
gcc att att gct ctc atc gct tcg ttt atc tat ctc cta ggg ttt ttt			336
Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe			
100	105	110	
ggt att gac ttt gtt cag tca ttt atc tca cgt gcc tct ggt gat gct			384
Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala			
115	120	125	
tgg gat ctc gcc gat acg atc gat gat gac cac ccg ctt gtc acg			432
Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr			
130	135	140	
tgc tct cca ccg act ccg atc gtt tcc gtt gct aaa tta cct aat ccg			480
Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro			
145	150	155	160
gaa cct att gtt acc gaa tcg ctt cct gag gaa gac gag gag att gtg			528
Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val			
165	170	175	
aaa tcg gtt atc gac gga gtt att cca tcg tac tcg ctt gaa tct cgt			576
Lys Ser Val Ile Asp Gly Val Ile Pro Ser Tyr Ser Leu Glu Ser Arg			
180	185	190	
ctc ggt gat tgc aaa aga gcg gcg tcg att cgt cgt gag gcg ttg cag			624
Leu Gly Asp Cys Lys Arg Ala Ala Ser Ile Arg Arg Glu Ala Leu Gln			
195	200	205	
aga gtc acc ggg aga tcg att gaa ggg tta ccg ttg gat gga ttt gat			672

## 130

	Arg Val Thr Gly Arg Ser Ile Glu Gly Leu Pro Leu Asp Gly Phe Asp			
	210	215	220	
	tat gaa tcg att ttg ggg caa tgc tgt gag atg cct gtt gga tac att			720
5	Tyr Glu Ser Ile Leu Gly Gln Cys Cys Glu Met Pro Val Gly Tyr Ile			
	225	230	235	240
	cag att cct gtt ggg att gct cca ttg ttg ctt gat ggt tat gag			768
10	Gln Ile Pro Val Gly Ile Ala Gly Pro Leu Leu Asp Gly Tyr Glu			
	245	250	255	
	tac tct gtt cct atg gct aca acc gaa ggt tgt ttg gtt gct agc act			816
	Tyr Ser Val Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Thr			
	260	265	270	
15	aac aga ggc tgc aag gct atg ttt atc tct ggt ggc gcc acc agt acc			864
	Asn Arg Gly Cys Lys Ala Met Phe Ile Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr			
	275	280	285	
20	gtt ctt aag gac ggt atg acc cga gca cct gtt cgg ttc gct tcg			912
	Val Leu Lys Asp Gly Met Thr Arg Ala Pro Val Val Arg Phe Ala Ser			
	290	295	300	
25	gcg aga cga gct tcg gag ctt aag ttt ttc ttg gag aat cca gag aac			960
	Ala Arg Arg Ala Ser Glu Leu Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Glu Asn			
	305	310	315	320
30	ttt gat act ttg gca gta gtc ttc aac agg tcg agt aga ttt gca aga			1008
	Phe Asp Thr Leu Ala Val Val Phe Asn Arg Ser Ser Arg Phe Ala Arg			
	325	330	335	
	ctg caa agt gtt aaa tgc aca atc gcg ggg aag aat gct tat gta agg			1056
	Leu Gln Ser Val Lys Cys Thr Ile Ala Gly Lys Asn Ala Tyr Val Arg			
	340	345	350	
35	tcc tgt tgt act ggt gat gct atg ggg atg aat atg gtt tct aaa			1104
	Phe Cys Cys Ser Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Val Ser Lys			
	355	360	365	
40	ggt gtg cag aat gtt ctt gag tat ctt acc gat gat ttc cct gac atg			1152
	Gly Val Gln Asn Val Leu Glu Tyr Leu Thr Asp Asp Phe Pro Asp Met			
	370	375	380	
45	gat gtg att gga atc tct ggt aac ttc tgt tcg gac aag aaa cct gct			1200
	Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala			
	385	390	395	400
50	gct gtg aac tgg att gag gga cgt ggt aaa tca gtt gtt tgc gag gct			1248
	Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala			
	405	410	415	
	gta atc aga gga gag atc gtg aac aag gtc ttg aaa acg agc gtg gct			1296
	Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala			
	420	425	430	

gct tta gtc gag ctc aac atg ctc aag aac cta gct ggc tct gct gtt Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val 435 440 445	1344
5 gca ggc tct cta ggt gga ttc aac gct cat gcc agt aac ata gtg tct Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser 450 455 460	1392
10 gct gta ttc ata gct act ggc caa gat cca gct caa aac gtg gag agt Ala Val Phe Ile Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser 465 470 475 480	1440
15 tct caa tgc atc acc atg atg gaa gct att aat gac ggc aaa gat atc Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile 485 490 495	1488
20 cat atc tca gtc act atg cca tct atc gag gtg ggg aca gtg gga gga His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly 500 505 510	1536
25 gga aca cag ctt gca tct caa tca gcg tgt tta aac ctg ctc gga gtt Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val 515 520 525	1584
30 aaa gga gca agc aca gag tcg ccg gga atg aac gca agg agg cta gcg Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala 530 535 540	1632
35 acg atc gta gcc gga gca gtt tta gct gga gag tta tct tta atg tca Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser 545 550 555 560	1680
40 gca att gca gct gga cag ctt gtg aga agt cac atg aaa tac aat aga Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg 565 570 575	1728
45 tcc agc cga gac atc tct gga gca acg aca acg aca aca aca aca aca Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 580 585 590	1776
50 tga <210> 112 <211> 592 <212> PRT <213> Arabidopsis thaliana	1779

&lt;400&gt; 112

Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn  
1 5 10 15

5

Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp  
20 25 30

10

Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser  
35 40 45

15 Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr  
50 55 60

20 Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys  
65 70 75 80

Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly  
85 90 95

25 Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe  
100 105 110

30 Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala  
115 120 125

35 Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr  
130 135 140

40 Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro  
145 150 155 160

Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val  
165 170 175

45 Lys Ser Val Ile Asp Gly Val Ile Pro Ser Tyr Ser Leu Glu Ser Arg  
180 185 190

50 Leu Gly Asp Cys Lys Arg Ala Ala Ser Ile Arg Arg Glu Ala Leu Gln  
195 200 205

## 133

Arg Val Thr Gly Arg Ser Ile Glu Gly Leu Pro Leu Asp Gly Phe Asp  
210 215 220

5 Tyr Glu Ser Ile Leu Gly Gln Cys Cys Glu Met Pro Val Gly Tyr Ile  
225 230 235 240

10 Gln Ile Pro Val Gly Ile Ala Gly Pro Leu Leu Asp Gly Tyr Glu  
245 250 255

Tyr Ser Val Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Thr  
260 265 270

15 Asn Arg Gly Cys Lys Ala Met Phe Ile Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr  
275 280 285

20 Val Leu Lys Asp Gly Met Thr Arg Ala Pro Val Val Arg Phe Ala Ser  
290 295 300

25 Ala Arg Arg Ala Ser Glu Leu Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Glu Asn  
305 310 315 320

30 Phe Asp Thr Leu Ala Val Val Phe Asn Arg Ser Ser Arg Phe Ala Arg  
325 330 335

35 Leu Gln Ser Val Lys Cys Thr Ile Ala Gly Lys Asn Ala Tyr Val Arg  
340 345 350

Phe Cys Cys Ser Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Val Ser Lys  
355 360 365

40 Gly Val Gln Asn Val Leu Glu Tyr Leu Thr Asp Asp Phe Pro Asp Met  
370 375 380

45 Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala  
385 390 395 400

50 Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala  
405 410 415

Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala  
420 425 430

Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val  
435 440 445

5

Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser  
450 455 460

10 Ala Val Phe Ile Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser  
465 470 475 480

15 Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile  
485 490 495

20 His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly  
500 505 510

Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val  
515 520 525

25 Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala  
530 535 540

30 Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser  
545 550 555 560

35 Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg  
565 570 575

40 Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
580 585 590

<210> 113

45 <211> 1401

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana ISP8

50 <220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1401)

5 &lt;223&gt;

	<400> 113		
10	atg gct gtt gcg ctc caa ttc agc cga tta tgc gtt cga ccg gat act Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr 1 5 10 15		48
15	ttc gtg cggtt gag aat cat ctc tct gga tcc gga tct ctc cgc cgg Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg 20 25 30		96
20	aaa gct tta tca gtc cgg tgc tcg tct ggc gat gag aac gct cct tcg Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser 35 40 45		144
25	cca tcg gtg gtg atg gac tcc gat ttc gac gcc aag gtg ttc cgt aag Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys 50 55 60		192
30	aac ttg acg aga agc gat aat tac aat cgt aaa ggg ttc ggt cat aag Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys 65 70 75 80		240
35	gag gag aca ctc aag ctc atg aat cga gag tac acc agt gat ata ttg Glu Glu Thr Leu Lys Leu Met Asn Arg Glu Tyr Thr Ser Asp Ile Leu 85 90 95		288
40	gag aca ctg aaa aca aat ggg tat act tat tct tgg gga gat gtt act Glu Thr Leu Lys Thr Asn Gly Tyr Thr Ser Trp Gly Asp Val Thr 100 105 110		336
45	gtg aaa ctc gct aaa gca tat ggt ttt tgc tgg ggt gtt gag cgt gct Val Lys Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Cys Trp Gly Val Glu Arg Ala 115 120 125		384
50	gtt cag att gca tat gaa gca cga aag cag ttt cca gag gag agg ctt Val Gln Ile Ala Tyr Glu Ala Arg Lys Gln Phe Pro Glu Glu Arg Leu 130 135 140		432
55	tgg att act aac gaa atc att cat aac ccg acc gtc aat aag agg ttg Trp Ile Thr Asn Glu Ile Ile His Asn Pro Thr Val Asn Lys Arg Leu 145 150 155 160		480
60	gaa gat atg gat gtt aaa att att ccg gtt gag gat tca aag aaa cag Glu Asp Met Asp Val Lys Ile Ile Pro Val Glu Asp Ser Lys Lys Gln 165 170 175		528
	ttt gat gta gta gag aaa gat gat gtg gtt atc ctt cct gcg ttt gga		576

## 136

	Phe Asp Val Val Glu Lys Asp Asp Val Val Ile Leu Pro Ala Phe Gly		
	180	185	190
5	gct ggt gtt gac gag atg tat gtt ctt aat gat aaa aag gtg caa att Ala Gly Val Asp Glu Met Tyr Val Leu Asn Asp Lys Lys Val Gln Ile		624
	195	200	205
10	gtt gac acg act tgt cct tgg gtg aca aag gtc tgg aac acg gtt gag Val Asp Thr Thr Cys Pro Trp Val Thr Lys Val Trp Asn Thr Val Glu		672
	210	215	220
15	aag cac aag aag ggg gaa tac aca tca gta atc cat ggt aaa tat aat Lys His Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Lys Tyr Asn		720
	225	230	235
20	cat gaa gag acg att gca act gcg tct ttt gca gga aag tac atc att His Glu Glu Thr Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Gly Lys Tyr Ile Ile		768
	245	250	255
25	gta aag aac atg aaa gag gca aat tac gtt tgt gat tac att ctc ggt Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly		816
	260	265	270
30	ggc caa tac gat gga tct agc tcc aca aaa gag gag ttc atg gag aaa Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys		864
	275	280	285
35	tcc aaa tac gca att tcg aag ggt ttc gat ccc gac aat gac ctt gtc Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val		912
	290	295	300
40	aaa gtt ggt att gca aac caa aca acg atg cta aag gga gaa aca gag Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu		960
	305	310	315
45	gag ata gga aga tta ctc gag aca aca atg atg cgc aag tat gga gtg Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val		1008
	325	330	335
50	act caa gag cga caa gac gca atc tat gag cta gtg gaa gag aag att Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile		1104
	355	360	365
	gac ctc atg cta gtg gtt ggc gga tgg aat tca agt aac acc tct cac Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His		1152
	370	375	380
	ctt cag gaa atc tca gag gca cgg gga atc cca tct tac tgg atc gat Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp		1200
	385	390	395
			400

<pre> agt gag aaa cggtata gga cct ggg aat aaa ata gcc tat aag ctc cac Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His 405   410                         415 </pre>	1248
<pre> 5      tat gga gaa ctg gtc gag aag gaa aac ttt ctc cca aag gga cca ata Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile 420   425                         430 </pre>	1296
<pre> 10     aca atc ggt gtg aca tca ggt gca tca acc ccg gat aag gtc gtg gaa Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu 435   440                         445 </pre>	1344
<pre> 15     gat gct ttg gtg aag gtg ttc gac att aaa cgt gaa gag tta ttg cag Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln 450   455                         460 </pre>	1392
<pre> ●      ctg gct tga Leu Ala 20     465 </pre>	1401
<pre> &lt;210&gt; 114 </pre>	
<pre> 25     &lt;211&gt; 466 </pre>	
<pre>         &lt;212&gt; PRT </pre>	
<pre> 30     &lt;213&gt; Arabidopsis thaliana ISPH </pre>	
<pre> &lt;400&gt; 114 </pre>	
<pre> 35     Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr 1                               5                           10                         15 </pre>	Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr 1                               5                           10                         15
<pre> ●      Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg 40     20                           25                         30 </pre>	
<pre> Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser 35                           40                         45 </pre>	
<pre> 45 </pre>	
<pre>           Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys           50                           55                         60 </pre>	Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys           50                           55                         60
<pre> 50 </pre>	
<pre>           Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys           65                           70                         75                         80 </pre>	Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys           65                           70                         75                         80

## 138

Glu Glu Thr Leu Lys Leu Met Asn Arg Glu Tyr Thr Ser Asp Ile Leu  
 85 90 95

5 Glu Thr Leu Lys Thr Asn Gly Tyr Thr Tyr Ser Trp Gly Asp Val Thr  
 100 105 110

Val Lys Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Cys Trp Gly Val Glu Arg Ala  
 10 115 120 125

Val Gln Ile Ala Tyr Glu Ala Arg Lys Gln Phe Pro Glu Glu Arg Leu  
 15 130 135 140

Trp Ile Thr Asn Glu Ile Ile His Asn Pro Thr Val Asn Lys Arg Leu  
 145 150 155 160

● 20 Glu Asp Met Asp Val Lys Ile Ile Pro Val Glu Asp Ser Lys Lys Gln  
 165 170 175

25 Phe Asp Val Val Glu Lys Asp Asp Val Val Ile Leu Pro Ala Phe Gly  
 180 185 190

Ala Gly Val Asp Glu Met Tyr Val Leu Asn Asp Lys Lys Val Gln Ile  
 30 195 200 205

Val Asp Thr Thr Cys Pro Trp Val Thr Lys Val Trp Asn Thr Val Glu  
 35 210 215 220

Lys His Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Lys Tyr Asn  
 225 230 235 240

● 40 His Glu Glu Thr Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Gly Lys Tyr Ile Ile  
 245 250 255

45 Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly  
 260 265 270

Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys  
 50 275 280 285

Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val  
 290 295 300

Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu  
305 310 315 320

5

Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val  
325 330 335

10

Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala  
340 345 350

15 Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile  
355 360 365

● 20 Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His  
370 375 380

25

Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His  
405 410 415

30

Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile  
420 425 430

35

Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu  
435 440 445

40

Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
450 455 460

Leu Ala  
465

45

<210> 115

<211> 2160

50

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2160)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 115

atg gct ttg tgt gct tat gca ttt cct ggg att ttg aac agg act ggt  
 Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly  
 1                   5                   10                   15

48

gtg gtt tca gat tct tct aag gca acc cct ttg ttc tct gga tgg att  
 Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile  
 20                 20                 25                 30

96

cat gga aca gat ctg cag ttt ttg ttc caa cac aag ctt act cat gag  
 His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu  
 35                 40                 45

144

25

gtc aag aaa agg tca cgt gtg gtt cag gct tcc tta tca gaa tct gga  
 Val Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly  
 50                 55                 60

192

30

gaa tac tac aca cag aga ccg cca acg cct att ttg gac act gtg aac  
 Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn  
 65                 70                 75                 80

240

35

tat ccc att cat atg aaa aat ctg tct ctg aag gaa ctt aaa caa cta  
 Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu  
 85                 90                 95

288

40

gca gat gaa cta agg tca gat aca att ttc aat gta tca aag act ggg  
 Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly  
 100                 105                 110

336

45

ggt cac ctt ggc tca agt ctt ggt gtt gag ctg act gtt gct ctt  
 Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu  
 115                 120                 125

384

50

cat tat gtc ttc aat gca ccg caa gat agg att ctc tgg gat gtt ggt  
 His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly  
 130                 135                 140

cat cag tct tat cct cac aaa atc ttg act ggt aga agg gac aag atg  
 His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met  
 145                 150                 155                 160

tcg aca tta agg cag aca gat ggt ctt gca gga ttt act aag cga tcg

432

480

528

Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser				
165	170	175		
gag agt gaa tat gat tgc ttt ggc acc ggc cac agt tcc acc acc atc				576
5 Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile				
180	185	190		
tca gca ggc cta ggg atg gct gtt ggt aga gat cta aaa gga aga aac				624
Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn				
10 195	200	205		
aac aat gtt att gcc gta ata ggt gat ggt gcc atg aca gca ggt caa				672
Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln				
210	215	220		
gct tat gaa gcc atg aat aat gct ggt tac ctg gac tct gac atg att				720
Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile				
225	230	235	240	
gtt atc tta aac gac aat aga caa gtt tct tta cct act gct act ctg				768
Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu				
245	250	255		
gat ggg cca gtt cct gtt gga gct cta agt agt gct ttg agc agg				816
25 Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg				
260	265	270		
tta cag tct aat agg cct ctc aga gaa cta aga gaa gtc gca aag gga				864
Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly				
30 275	280	285		
gtt act aag cag att ggt ggt cct atg cat gag ctt gct gca aaa gtt				912
Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val				
290	295	300		
gat gaa tat gct cgt ggc atg att agt ggt tct gga tca aca ttg ttt				960
35 Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe				
305	310	315	320	
gaa gaa ctt gga ctt tac tat att ggt cct gtg gat ggt cac aac att				1008
Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile				
325	330	335		
gat gat cta att gcg att ctc aaa gag gtt aga agt act aaa aca aca				1056
45 Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr				
340	345	350		
ggt cca gta ctg atc cat gtt gtc act gag aaa ggc aga ggt tat cca				1104
Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro				
50 355	360	365		
tat gct gag aga gct gca gat aag tat cat gga gtt gcc aag ttt gat				1152
Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp				
370	375	380		

	cca gca aca gga aag caa ttc aaa gcc agt gcc aag aca cag tcc tat	1200
	Pro Ala Thr Gly Lys Gln Phe Lys Ala Ser Ala Lys Thr Gln Ser Tyr	
385	390	395
		400
5	aca aca tat ttt gcc gag gct tta att gca gaa gca gaa gca gat aaa	1248
	Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ile Ala Glu Ala Glu Ala Asp Lys	
	405	410
		415
10	gac att gtt gca atc cat gct gcc atg ggg ggt ggg acc gga atg aac	1296
	Asp Ile Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Thr Gly Met Asn	
	420	425
		430
15	ctt ttc cat cgt cgc ttc cca aca agg tgt ttt gat gtt gga ata gca	1344
	Leu Phe His Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile Ala	
	435	440
		445
20	gaa caa cat gca gta acc ttt gct gct gga ttg gct tgt gaa ggc att	1392
	Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly Ile	
	450	455
		460
	aaa cct ttc tgt gca atc tat tcg tct ttc atg cag agg gct tat gac	1440
	Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr Asp	
	465	470
		475
25	cag gta gtg cat gac gtt gat ttg caa aag ctg ccc gtg agg ttt gca	1488
	Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe Ala	
	485	490
		495
30	atg gac aga gca ggt ctt gtt gga gca gat ggt cca aca cat tgt ggt	1536
	Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys Gly	
	500	505
		510
35	gca ttt gat gtt act tac atg gca tgt ctt cct aac atg gtt gta atg	1584
	Ala Phe Asp Val Thr Tyr Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Val Val Met	
	515	520
		525
40	gct cct tct gat gaa gcg gag cta ttt cac atg gta gca act gct gcc	1632
	Ala Pro Ser Asp Glu Ala Glu Leu Phe His Met Val Ala Thr Ala Ala	
	530	535
		540
	gcc att gat gac aga cca agt tgt ttt aga tac cca aga gga aat ggg	1680
	Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Gly	
	545	550
		555
45	atc ggt gta gag ctt ccg gct gga aac aaa gga att cct ctt gag gtt	1728
	Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val	
	565	570
		575
50	ggt aaa ggt agg ata ttg att gag ggg gag aga gtg gct cta ttg gga	1776
	Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly	
	580	585
		590
	tat ggc tca gca gtg cag aac tgt ttg gat gct gct att gtg cta gaa	1824

## 143

Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu				
595	600	605		
tcc cgc ggc tta caa gta aca gtt gca gat gca cgt ttc tgc aaa cca				1872
5 Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro				
610	615	620		
ctg gac cat gcc ctc ata agg agc ctt gca aaa tca cat gaa gtg cta				1920
Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu				
10 625	630	635	640	
atc act gtc gaa gga tca att gga ggt ttt gga tct cat gtt gtt				1968
Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val				
15 645	650	655		
cag ttc atg gcc tta gat ggg ctt ctt gat ggc aag ttg aag tgg aga				2016
Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg				
15 660	665	670		
cca ata gtt ctt cct gat cga tac att gac cat gga tct cct gtt gat				2064
Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp				
20 675 ,	680	685		
cag ttg gcg gaa gct ggc cta aca cca tct cac att gca gca aca gta				2112
Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val				
25 690	695	700		
ttt aac ata ctt gga caa acc aga gag gct cta gag gtc atg aca taa				2160
Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr				
30 705	710	715		
<210> 116				
35 <211> 719				
<212> PRT				
<213> Lycopersicon esculentum				
40				
<400> 116				
45 Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly				.
1	5	10	15	
Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile				
50 20	25	30		
His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu				
35	40	45		

Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly  
50 55 60

5

Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn  
65 70 75 80

10 Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu  
85 90 95

15 Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly  
100 105 110

● 20 Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu  
115 120 125

His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly  
25 130 135 140

His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met  
145 150 155 160

30 Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser  
165 170 175

35 Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile  
180 185 190

● 40 Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn  
195 200 205

Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln  
45 210 215 220

Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile  
225 230 235 240

50 Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu  
245 250 255

Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg  
 260 265 270

5 Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly  
 275 280 285

10 Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val  
 290 295 300

15 Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe  
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile  
 325 330 335

20 Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr  
 340 345 350

25 Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro  
 355 360 365

30 Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp  
 370 375 380

35 Pro Ala Thr Gly Lys Gln Phe Lys Ala Ser Ala Lys Thr Gln Ser Tyr  
 385 390 395 400

35 Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ile Ala Glu Ala Glu Ala Asp Lys  
 405 410 415

40 Asp Ile Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Thr Gly Met Asn  
 420 425 430

45 Leu Phe His Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile Ala  
 435 440 445

50 Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly Ile  
 450 455 460

Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr Asp  
 465 470 475 480

Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe Ala  
485 490 495

5 Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys Gly  
500 505 510

10 Ala Phe Asp Val Thr Tyr Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Val Val Met  
515 520 525

15 Ala Pro Ser Asp Glu Ala Glu Leu Phe His Met Val Ala Thr Ala Ala  
530 535 540

20 Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Gly  
545 550 555 560

Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val  
565 570 575

25 Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly  
580 585 590

30 Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu  
595 600 605

35 Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro  
610 615 620

40 Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu  
625 630 635 640

Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val  
645 650 655

45 Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg  
660 665 670

50 Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp  
675 680 685

Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val  
 690                    695                    700

5 Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr  
 705                    710                    715

10 <210> 117

<211> 1434

<212> DNA

15 <213> Arabidopsis thaliana

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

25 <223>

30	atg atg aca tta aac tca cta tct cca gct gaa tcc aaa gct att tct Met Met Thr Leu Asn Ser Leu Ser Pro Ala Glu Ser Lys Ala Ile Ser 1                    5                    10                    15	48
35	ttc ttg gat acc tcc agg ttc aat cca atc cct aaa ctc tca ggt ggg Phe Leu Asp Thr Ser Arg Phe Asn Pro Ile Pro Lys Leu Ser Gly Gly 20                    25                    30	96
40	ttt agt ttg agg agg aat caa ggg aga ggt ttt gga aaa ggt gtt Phe Ser Leu Arg Arg Asn Gln Gly Arg Gly Phe Gly Lys Gly Val 35                    40                    45	144
45	aag tgt tca gtg aaa gtg cag cag caa caa cct cct cca gca tgg Lys Cys Ser Val Lys Val Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Trp 50                    55                    60	192
50	cct ggg aga gct gtc cct gag gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca Pro Gly Arg Ala Val Pro Glu Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro 65                    70                    75                    80	240
	aaa ccc atc tct atc gtt gga tct act ggt tct att ggc act cag aca Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr 85                    90                    95	288
	ttg gat att gtg gct gag aat cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta	336

## 148

	Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu		
	100	105	110
5	gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe		384
	115	120	125
10	aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac gag tca ctg att aat gag ctt Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu		432
	130	135	140
15	aaa gag gct tta gct gat ttg gac tat aaa ctc gag att att cca gga Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly		480
	145	150	155
20	160 gag caa ggaa gtg att gag gtt gcc cga cat cct gaa gct gta acc gtt Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val		528
	165	170	175
25	180 gtt acc gga ata gta ggt tgt gcg gga cta aag cct acg gtt gct gca Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala		576
	185	190	
30	195 att gaa gca gga aag gac att gct ctt gca aac aaa gag aca tta atc Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile		624
	200	205	
35	210 <del>gca ggt ggt cct ttc gtg ctt ccg ctt gee aae aaa cat aat gta aag</del> Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys		672
	215	220	
40	225 att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct gcc ata ttt cag tgt att caa Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln		720
	230	235	240
45	245 ggg ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag ata atc ttg act gca tct ggt Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly		768
	250	255	
50	260 gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa aag cta aag gaa gtt aaa gta Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val		816
	265	270	
55	275 gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg aac atg gga aag aaa atc act Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Ile Thr		864
	280	285	
60	290 gtg gac tct acg ctt ttc aac aag ggt ctt gag gtc att gaa gcg Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala		912
	295	300	
65	305 cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac gat ata gag att gtc att cat His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His		960
	310	315	320

	ccg caa agt atc ata cat tcc atg att gaa aca cag gat tca tct gtg	1008
	Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val	
	325 330 335	
5	ctt gct caa ttg ggt tgg cct gat atg cgt tta ccg att ctc tac acc	1056
	Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr	
	340 345 350	
10	atg tca tgg ccc gat aga gtt cct tgt tct gaa gta act tgg cca aga	1104
	Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg	
	355 360 365	
15	ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt tca ttg act ttc aag aaa cca gac aat	1152
	Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn	
	370 375 380	
20	gtg aaa tac cca tcc atg gat ctt gct tat gct ggt gga cga gct gga	1200
	Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly	
	385 390 395 400	
	ggc aca atg act gga gtt ctc agc gcc gcc aat gag aaa gct gtt gaa	1248
	Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu	
	405 410 415	
25	atg ttc att gat gaa aag ata agc tat ttg gat atc ttc aag gtt gtt	1296
	Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val	
	420 425 430	
30	gaa tta aca tgc gat aaa cat cga aac gag ttg gta aca tca ccg tct	1344
	Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser	
	435 440 445	
35	ctt gaa gag att gtt cac tat gac ttg tgg gca cgt gaa tat gcc gcg	1392
	Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala	
	450 455 460	
40	aat gtg cag ctt tct ggt gct agg cca gtt cat gca tga	1434
	Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala	
	465 470 475	
	<210> 118	
45	<211> 477	
	<212> PRT	
	<213> Arabidopsis thaliana	
50	<400> 118	

150

Met Met Thr Leu Asn Ser Leu Ser Pro Ala Glu Ser Lys Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

5 Phe Leu Asp Thr Ser Arg Phe Asn Pro Ile Pro Lys Leu Ser Gly Gly  
 20 25 30

10 Phe Ser Leu Arg Arg Arg Asn Gln Gly Arg Gly Phe Gly Lys Gly Val  
 35 40 45

15 Lys Cys Ser Val Lys Val Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Trp  
 50 55 60

Pro Gly Arg Ala Val Pro Glu Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro  
 65 70 75 80

20 Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr  
 85 90 95

25 Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu  
 100 105 110

30 Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe  
 115 120 125

35 Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu  
 130 135 140

40 Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly  
 145 150 155 160

45 Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val  
 165 170 175

50 Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile  
 195 200 205

Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys  
 210 215 220

Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln  
225 230 235 240

5

Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly  
245 250 255

10

Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val  
260 265 270

15

Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr  
275 280 285

20

Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala  
290 295 300

25

His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His  
305 310 315 320

Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val  
325 330 335

30

Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr  
340 345 350

35

Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg  
355 360 365

40

Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn  
370 375 380

Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly  
385 390 395 400

45

Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu  
405 410 415

50

Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val  
420 425 430

152

Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser  
 435                    440                    445

5    Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala  
 450                    455                    460

10   Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala  
 465                    470                    475

<210> 119

15   <211> 884

<212> DNA

20   <213> Adonis palaestina clone ApIPI28

<220>

25   <221> CDS

<222> (180)..(884)

<223>

30

35	<400> 119 cgtcgatcg gattaatcct ttataatagta ttttctccac caccactaaa acattatcg cttcgtgttc ttctcccgct gttcatcttc agcagcggtg tcgtactctt tctatttctt	60 120
	cttccatcac taacagtcc tggccgagggt tgaatcggtt gttcgctca acgtcgact	179
40	atg ggt gaa gtc gct gat gct ggt atg gat gcc gtc cag aag cgg ctt Met Gly Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu 1                5                    10                    15	227
45	atg ttc gac gat gaa tgt att ttg gtg gat gag aat gac aag gtc gtc Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val 20                25                    30	275
50	gga cat gat tcc aaa tac aac tgt cat ttg atg gaa aag ata gag gca Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala 35                40                    45	323
	gaa aac ttg ctt cac aga gcc ttc agt gtt ttc tta ttc aac tca aaa Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys 50                55                    60	371

	tac gag ttg ctt ctt cag caa cga tct gca acg aag gta aca ttc ccg Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro 65 70 75 80	419
5	ctc gta tgg aca aac acc tgt tgc agc cat ccc ctc ttc cgt gat tcc Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser 85 90 95	467
10	gaa ctc ata gaa gaa aat ttt ctc ggg gta cga aac gct gca caa agg Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg 100 105 110	515
15	aag ctt tta gac gag cta ggc att cca gct gaa gac gta cca gtt gat Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp 115 120 125	563
20	gaa ttc act cct ctt ggt cgc att ctt tac aaa gct cca tct gac gga Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly 130 135 140	611
25	aaa tgg gga gag cac gaa ctg gac tat ctt ctg ttt att gtc cga gat Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp 145 150 155 160	659
30	gtg aaa tac gat cca aac cca gat gaa gtt gct gac gct aag tac gtt Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val 165 170 175	707
35	aat cgc gag gag ttg aaa gag ata ctg aga aaa gct gat gca ggt gaa Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu 180 185 190	755
40	gag gga ata aag ttg tct cct tgg ttt aga ttg gtt gtg gat aac ttt Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe 195 200 205	803
45	ttg ttc aag tgg tgg gat cat gta gag gag ggg aag att aag gac gtc Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val 210 215 220	851
50	gcc gac atg aaa act atc cac aag ttg act taa Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr 225 230	884
	<210> 120	
	<211> 234	
	<212> PRT	
	<213> Adonis palaestina clone ApIPI28	

&lt;400&gt; 120

5 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
1 5 10 15

10 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
20 25 30

15 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
35 40 45

Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
50 55 60

20 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro  
65 70 75 80

25 Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser  
85 90 95

30 Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg  
100 105 110

35 Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp  
115 120 125

40 Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly  
130 135 140

45 Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp  
145 150 155 160

50 Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val  
165 170 175

Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu  
180 185 190

195 200 205

Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val  
 210 215 220

5

Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr  
 225 230

10

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 1402

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (52)..(1317)

&lt;223&gt;

30

<400> 121  
 aagtctttgc ctctttggtt tactttcctc tgttttcgat ccatttagaa a atg tta  
 Met Leu  
 1

57

35 ttc acg agg agt gtt gct cgg att tct tct aag ttt ctg aga aac cgt  
 Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg Asn Arg  
 5 10 15

105

40 agc ttc tat ggc tcc tct caa tct ctc gcc tct cat cgg ttc gca atc  
 Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe Ala Ile  
 20 25 30

153

45 att ccc gat cag ggt cac tct tgt tct gac tct cca cac aag ggt tac  
 Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys Gly Tyr  
 35 40 45 50

201

50 gtt tgc aga aca act tat tca ttg aaa tct ccg gtt ttt ggt gga ttt  
 Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly Gly Phe  
 55 60 65

249

agt cat caa ctc tat cac cag agt agc tcc ttg gtt gag gag gag ctt  
 Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu Glu Leu  
 70 75 80

297

gac cca ttt tcg ctt gtt gcc gat gag ctg tca ctt ctt agt aat aag Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser Asn Lys 85 90 95	345
5 ttg aga gag atg gta ctt gcc gag gtt cca aag ctt gcc tct gct gct Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser Ala Ala 100 105 110	393
10 gag tac ttc ttc aaa agg ggt gtg caa gga aaa cag ttt cgt tca act Glu Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Val Gln Gly Lys Gln Phe Arg Ser Thr 115 120 125 130	441
15 att ttg ctg ctg atg gcg aca gct ctg gat gta cga gtt cca gaa gca Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro Glu Ala 135 140 145	489
20 ttg att ggg gaa tca aca gat ata gtc aca tca gaa tta cgc gta agg Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg Val Arg 150 155 160	537
25 caa cgg ggt att gct gaa atc act gaa atg ata cac gtc gca agt cta Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala Ser Leu 165 170 175	585
30 tcc tta aat gtt gta atg ggt aac aag atg tcg gta tta gca gga gac Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala Gly Asp 195 200 205 210	681
35 ttc ttg ctc tcc cgg gct tgt ggg gct ctc gct gct tta aag aac aca Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Leu Lys Asn Thr 215 220 225	729
40 gag gtt gta gca tta ctt gca act gct gta gaa cat ctt gtt acc ggt Glu Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Val Glu His Leu Val Thr Gly 230 235 240	777
45 gaa acc atg gag ata act agt tca acc gag cag cgt tat agt atg gac Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser Met Asp 245 250 255	825
50 tac tac atg cag aag aca tat tat aag aca gca tcg cta atc tct aac Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ser Asn 260 265 270	873
55 agc tgc aaa gct gtt gcc gtt ctc act gga caa aca gca gaa gtt gcc Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu Val Ala 275 280 285 290	921
60 gtg tta gct ttt gag tat ggg agg aat ctg ggt tta gca ttc caa tta	969

Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu  
295 300 305

5 ata gac gac att ctt gat ttc acg ggc aca tct gcc tct ctc gga aag 1017  
Ile Asp Asp Ile Leu Asp Phe Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu Gly Lys  
310 315 320

gga tcg ttg tca gat att cgc cat gga gtc ata aca gcc cca atc ctc 1065  
 Gly Ser Leu Ser Asp Ile Arg His Gly Val Ile Thr Ala Pro Ile Leu  
 10 325 330 335

ttt gcc atg gaa gag ttt cct caa cta cgc gaa gtt gtt gat caa gtt 1113  
 Phe Ala Met Glu Glu Phe Pro Gln Leu Arg Glu Val Val Asp Gln Val  
 340 345 350

15 gaa aaa gat cct agg aat gtt gac att gct tta gag tat ctt ggg aag 1161  
Glu Lys Asp Pro Arg Asn Val Asp Ile Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Lys  
355 360 365 370

20 agc aag gga ata cag agg gca aga gaa tta gcc atg gaa cat gcg aat 1209  
Ser Lys Gly Ile Gln Arg Ala Arg Glu Leu Ala Met Glu His Ala Asn  
375 380 385

25 cta gca gca gct gca atc ggg tct cta cct gaa aca gac aat gaa gat 1257  
 Leu Ala Ala Ala Ala Ile Gly Ser Leu Pro Glu Thr Asp Asn Glu Asp  
                  390             395             400

gtc aaa aga tcg agg cgg gca ctt att gac ttg acc cat aga gtc atc 1305  
 Val Lys Arg Ser Arg Arg Ala Leu Ile Asp Leu Thr His Arg Val Ile  
 30 405 410 415

acc aga aac aag tgagat taatgtttct ctctatacac caaaacatc 1357  
Thr Arg Asn Lys  
420

35 ctcatttcat ttgttaggatt ttgttggtcc aattcgtttc acgaa 1402

<210> 122

<211> 422

<212> PRT

45 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 122

50 Met Leu Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg  
1 5 10 15

Asn Arg Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe  
20 25 30

5 Ala Ile Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys  
35 40 45

Gly Tyr Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly  
10 50 55 60

Gly Phe Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Leu Val Glu Glu  
15 65 70 75 80

Glu Leu Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser  
20 85 90 95

Asn Lys Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser  
25 100 105 110

30 Ser Thr Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro  
115 120 125

35 Glu Ala Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg  
145 150 155 160

Val Arg Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala  
40 165 170 175

Ser Leu Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly  
180 185 190

45 Val Gly Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala  
195 200 205

50 Gly Asp Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys  
210 215 220

Asn Thr Glu Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Val Glu His Leu Val  
225 230 235 240

5

Thr Gly Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser  
245 250 255

10

Met Asp Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile  
260 265 270

15

Ser Asn Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu  
275 280 285

15

val Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe  
290 295 300

20

Gln Leu Ile Asp Asp Ile Leu Asp Phe Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu  
305 310 315 320

25

Ile Leu Phe Ala Met Glu Glu Phe Pro Gln Leu Arg Glu Val Val Asp  
340 345 350

30

Gln Val Glu Lys Asp Pro Arg Asn Val Asp Ile Ala Leu Glu Tyr Leu  
355 360 365

35 Gly Lys Ser Lys Gly Ile Gln Arg Ala Arg Glu Leu Ala Met Glu His  
370 375 380

40 Ala Asn Leu Ala Ala Ala Ile Gly Ser Leu Pro Glu Thr Asp Asn  
385 390 395 400

45

Val Ile Thr Arg Asn Lys  
420

50

<210> 123

<211> 1155

160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

5

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1155)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 123

atg	agt	gtg	agt	tgt	tgt	tgt	agg	aat	ctg	ggc	aag	aca	ata	aaa	aag	48
Met	Ser	Val	Ser	Cys	Cys	Cys	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Lys	Lys	
1				5					10				15			

gca	ata	cct	tca	cat	cat	ttg	cat	ctg	aga	agt	ctt	ggg	agt	ctc	96	
Ala	Ile	Pro	Ser	His	His	Leu	His	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	
20				20				25				30				

tat	cgt	cgt	cgt	atc	caa	agc	tct	tca	atg	gag	acc	gat	ctc	aag	tca	144
Tyr	Arg	Arg	Arg	Ile	Gln	Ser	Ser	Ser	Met	Glu	Thr	Asp	Leu	Lys	Ser	
35					35			40				45				

acc	ttt	ctc	aac	gtt	tat	tct	gtt	ctc	aag	tct	gac	ctt	ctt	cat	gac	192
Thr	Phe	Leu	Asn	Val	Tyr	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	His	Asp	
50					50			55			60					

cct	tcc	ttc	gaa	ttc	acc	aat	gaa	tct	cgt	ctc	tgg	gtt	gat	cgg	atg	240
Pro	Ser	Phe	Glu	Phe	Thr	Asn	Glu	Ser	Arg	Leu	Trp	Val	Asp	Arg	Met	
35					65			70			75		80			

ctg	gac	tac	aat	gta	cgt	gga	ggg	aaa	ctc	aat	cgg	ggt	ctc	tct	gtt	288
Leu	Asp	Tyr	Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Gly	Leu	Ser	Val	
40					85				90			95				

gtt	gac	agt	ttc	aaa	ctt	ttg	aag	caa	ggc	aat	gat	ttg	act	gag	caa	336
Val	Asp	Ser	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Gly	Asn	Asp	Leu	Thr	Glu	Gln	
					100			105			110					

gag	gtt	ttc	ctc	tct	tgt	gct	ctc	ggt	tgg	tgc	att	gaa	tgg	ctc	caa	384
Glu	Val	Phe	Leu	Ser	Cys	Ala	Leu	Gly	Trp	Cys	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	
45					115			120			125					

gct	tat	ttc	ctt	gtg	ctt	gat	gat	att	atg	gat	aac	tct	gtc	act	cgc	432
Ala	Tyr	Phe	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Ile	Met	Asp	Asn	Ser	Val	Thr	Arg	
50					130			135			140					

cgt	ggt	caa	cct	tgc	tgg	ttc	aga	gtt	cct	cag	gtt	ggt	atg	gtt	gcc	480
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

## 161

	Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala		
145	150	155	160
	atc aat gat ggg att cta ctt cgc aat cac atc cac agg att ctc aaa		528
5	Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys		
	165	170	175
	aag cat ttc cgt gat aag cct tac tat gtt gac ctt gtt gat ttg ttt		576
	Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe		
10	180	185	190
	aat gag gtt gag ttg caa aca gct tgt ggc cag atg ata gat ttg atc		624
	Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile		
	195	200	205
15	acc acc ttt gaa gga gaa aag gat ttg gcc aag tac tca ttg tca atc		672
	Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile		
	210	215	220
20	cac cgt cgt att gtc cag tac aaa acg gct tat tac tca ttt tat ctc		720
	His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu		
	225	230	235
25	cct gtt gct tgt gcg ttg ctt atg gcg ggc gaa aat ttg gaa aac cat		768
	Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His		
	245	250	255
	att gac gtg aaa aat gtt ctt gtt gac atg gga atc tac ttc caa gtg		816
	Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val		
30	260	265	270
	cag gat gat tat ctg gat tgt ttt gct gat ccc gag acg ctt ggc aag		864
	Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys		
	275	280	285
35	ata gga aca gat ata gaa gat ttc aaa tgc tcg tgg ttg gtg gtt aag		912
	Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys		
	290	295	300
40	ata tta gag cgc tgc agc gaa caa act aag ata tta tat gag aac		960
	Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn		
	305	310	315
45	320		
	tat ggt aaa ccc gac cca tcg aac gtt gct aaa gtg aag gat ctc tac		1008
	Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr		
	325	330	335
	aaa gag ctg gat ctt gag gga gtt ttc atg gag tat gag agc aaa agc		1056
	Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser		
50	340	345	350
	355		
	tac gag aag ctg act gga gcg att gag gga cac caa agt aaa gca atc		1104
	Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile		
	360		
	365		

caa gca gtg cta aaa tcc ttc ttg gct aag atc tac aag agg cag aag 1152  
Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
370 375 380

5 tag 1155

10 <210> 124

<211> 384

<212> PRT

15 <213> Arabidopsis thaliana

20 <400> 124

Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
1 5 10 15

25 Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu  
20 25 30

30 Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser  
35 40 45

35 Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp  
50 55 60

40 Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met  
65 70 75 80

45 Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val  
85 90 95

50 Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln  
100 105 110

Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln  
115 120 125

Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg  
130 135 140

163

Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala  
145 150 155 160

5 Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys  
165 170 175

10 Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe  
180 185 190

15 Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile  
195 200 205

20 Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile  
210 215 220

25 His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu  
225 230 235 240

30 Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His  
245 250 255

35 Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val  
260 265 270

40 Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys  
290 295 300

45 Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn  
305 310 315 320

50 Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr  
325 330 335

Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser  
340 345 350

164

Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile  
 355                    360                    365

5    Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
 370                    375                    380

10   <210> 125

<211> 1101

<212> DNA

15   <213> Sinabs alba

20   <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1101)

25   <223>

30	<400> 125		
	atg gct tct tca gtg act cct cta ggt tca tgg gtt ctt ctt cac cat		48
	Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His		
	1                    5                    10                    15		
35	cat cct tca act atc tta acc caa tcc aga tcc aga tct cct cct tct		96
	His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser		
	20                    25                    30		
40	ctc atc acc ctt aaa ccc atc tcc ctc act cca aaa cgc acc gtt tcg		144
	Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser		
	35                    40                    45		
45	tct tct tcc tcc tcc atc acc aaa gaa gac aac aac ctc aaa		192
	Ser Ser Ser Ser Ser Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys		
	50                    55                    60		
50	tcc tct tcc tcc ttc gat ttc atg tct tac atc atc cgc aaa gcc		240
	Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala		
	65                    70                    75                    80		
55	gac tcc gtc aac aaa gcc tta gac tcc gcc gtc cct ctc cgg gag cca		288
	Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro		
	85                    90                    95		
	ctc aag atc cac gaa gcg atg cgt tac tct ctc ctc gcc gga gga aaa		336

## 165

	Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys		
	100	105	110
5	cgc gtc aga cca gtt ctc tgc atc gcc gcg tgc gag cta gtc gga gga Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly		384
	115	120	125
10	gaa gag tct tta gct atg ccg gcg cgt tgc gcc gtg gaa atg atc cac Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His		432
	130	135	140
15	acc atg tcg ttg atc cac gac gac ttg cct tgt atg gat aac gac gat Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp		480
	145	150	155
20	ctc cgc cgc gga aag ccc acg aat cac aaa gtt tac ggc gaa gac gtg Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val		528
	165	170	175
25	gcg gtt tta gcc gga gac gcg ctt ctt tcg ttc gcc ttc gag cat tta Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu		576
	180	185	190
30	gtg gca gct acg agc tcg gag gtt tct ccg gcg aga gtg gtt aga gct Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala		624
	195	200	205
35	caa gtg gtg gat ata agc agt gaa ggg ttg gac tta aac aac gtc gga Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly		720
	225	230	235
40	ttg gag cat ttg aag ttt ata cat ttg cat aaa acg gcg gcg ttg ctt Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu		768
	245	250	255
45	gaa gct tca gcg gtt ttg ggt ggg atc atc ggt gga ggg agt gat gaa Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ser Asp Glu		816
	260	265	270
50	cag gtg gtt gat gat atc ttg gac gtg acg aaa tcg tct caa gaa ctg Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu		864
	275	280	285
	290	295	300
	305	310	315
	320		

aag ctc atg ggt ttg gag aaa tcg aga gag ttc gct gag aag ttg aat		1008	
Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn			
325	330	335	
<b>5</b>			
aca gag gca cgt gat cag ctt tta ggg ttt gat tcc gac aag gtt gct		1056	
Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala			
340	345	350	
<b>10</b>	cct ttg ttg gct ttg gct aat tac att gcc aat aga cag aac tga	1101	
Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn			
355	360	365	
<b>15</b>	<210> 126		
<211> 366			
<b>20</b>	<212> PRT		
<213> Sinabs alba			
<b>25</b>	<400> 126		
Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His			
1	5	10	15
<b>30</b>	His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser		
20	25	30	
<b>35</b>	Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser		
35	40	45	
<b>40</b>	Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys		
50	55	60	
<b>45</b>	Ser Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala		
65	70	75	80
<b>50</b>	Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro		
85	90	95	
Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys			
100	105	110	

167

Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly  
 115                           120                           125

5   Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His  
     130                       135                       140

10   Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp  
     145                       150                       155                       160

15   Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val  
     165                       170                       175

Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu  
 180                       185                       190

20   Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala  
     195                       200                       205

25   Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly  
     210                       215                       220

30   Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly  
     225                       230                       235                       240

35   Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu  
     245                       250                       255

Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Ile Ile Gly Gly Ser Asp Glu  
 260                       265                       270

40   Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe  
     275                       280                       285

45   Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu  
     290                       295                       300

50   Gly Lys Thr Ala Gly Lys Asp Leu Ile Ala Asp Lys Leu Thr Tyr Pro  
     305                       310                       315                       320

Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn  
     325                       330                       335

Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala  
 340                           345                           350

5

Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn  
 355                           360                           365

10

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 930

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Erwinia uredovora

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (1)...(930)

&lt;223&gt;

30

&lt;400&gt; 127

atg aat aat ccg tcg tta ctc aat cat gcg gtc gaa acg atg gca gtt  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1                           5                           10                           15

48

35

ggc tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc  
 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20                           25                           30

96

40

cgg cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat  
 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
 35                           40                           45

144

45

gtt att gac gat cag acg ctg ggc ttt cag gcc cgg cag cct gcc tta  
 Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
 50                           55                           60

192

50

caa acg ccc gaa caa cgt ctg atg caa ctt gag atg aaa acg cgc cag  
 Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln  
 65                           70                           75                           80

240

gcc tat gca gga tcg cag atg cac gaa ccg gcg ttt gct ttt cag  
 Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln  
 85                           90                           95

288

	gaa gtg gct atg gct cat gat atc gcc ccg gct tac gcg ttt gat cat Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His 100 105 110	336
5	ctg gaa ggc ttc gcc atg gat gta cgc gaa gcg caa tac agc caa ctg Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu 115 120 125	384
10	gat gat acg ctg cgc tat tgc tat cac gtt gca ggc gtt gtc ggc ttg Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu 130 135 140	432
15	atg atg gcg caa atc atg ggc gtg cgg gat aac gcc acg ctg gac cgc Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg 145 150 155 160	480
20	gcc tgt gac ctt ggg ctg gca ttt cag ttg acc aat att gct cgc gat Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp 165 170 175	528
25	att gtg gac gat gcg cat gcg ggc cgc tgt tat ctg ccg gca agc tgg Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Ser Trp 180 185 190	576
30	ctg gag cat gaa ggt ctg aac aaa gag aat tat gcg gca cct gaa aac Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Asn 195 200 205	624
35	cgt cag gcg ctg agc cgt atc gcc cgt cgt ttg gtg cag gaa gca gaa Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu Ala Glu 210 215 220	672
40	cct tac tat ttg tct gcc aca gcc ggc ctg gca ggg ttg ccc ctg cgt Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro Leu Arg 225 230 235 240	720
45	tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag gtt tac cgg aaa ata ggt Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly 245 250 255	768
50	gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa gcc tgg gat cag cgg cag tca Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser 260 265 270	816
	acg acc acg ccc gaa aaa tta acg ctg ctg ctg gcc tct ggt cag Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln 275 280 285	864
	gcc ctt act tcc cgg atg cgg gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu 290 295 300	912
	tgg cag cgc ccg ctc tag	930

170

Trp Gln Arg Pro Leu  
305

5 <210> 128

<211> 309

10 <212> PRT

<213> Erwinia uredovora

15 <400> 128

Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
1 5 10 15

20

Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
20 25 30

25 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
35 40 45

30 Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
50 55 60

35 Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln  
65 70 75 80

40 Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln  
85 90 95

45 Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His  
100 105 110

50 Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu  
115 120 125

Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu  
130 135 140

Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg  
145 150 155 160

Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp  
165 170 175

5

Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Ser Trp  
180 185 190

10

Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Asn  
195 200 205

15

Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu Ala Glu  
210 215 220

20

Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro Leu Arg  
225 230 235 240

Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly  
245 250 255

25

Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser  
260 265 270

30

Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
275 280 285

35

Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
290 295 300

40

Trp Gln Arg Pro Leu  
305

<210> 129

45 <211> 1479

<212> DNA

<213> Erwinia uredovora

50

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1479)

5 &lt;223&gt;

<400> 129				
10 atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc ggt ggc ctg gca ctg	48			
Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu				
1 5 10 15				
15 gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc tta ctg ctt gaa caa	96			
Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln				
20 25 30				
20 cgt gat aaa ccc ggc ggt cggt gct tat gtc tac gag gat cag ggg ttt	144			
Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe				
20 35 40 45				
25 acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat ccc agt gcc att gaa	192			
Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu				
50 55 60				
25 gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa gag tat gtc gaa ctg	240			
Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu				
65 70 75 80				
30 ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg gag tca ggg aag gtc	288			
Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val				
85 90 95				
35 ttt aat tac gat aac gat caa acc cgg ctc gaa gcg cag att cag cag	336			
Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln				
100 105 110				
40 ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag ttt ctg gac tat tca	384			
Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser				
115 120 125				
45 cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc ggt act gtc cct ttt	432			
Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe				
130 135 140				
45 tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct caa ctg gcg aaa ctg	480			
Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu				
145 150 155 160				
50 cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc agt tac atc gaa gat	528			
Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp				
165 170 175				
gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg ctg ttg gtg ggc ggc	576			

## 173

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly			
180	185	190	
5 aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg ata cac gcg ctg gag			624
Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu			
195	200	205	
10 cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc acc ggc gca tta gtt			672
Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val			
210	215	220	
15 cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt ggc gaa gtc gtg tta			720
Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu			
225	230	235	240
20 · aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga aac aag att gaa gcc			768
Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala			
245	250	255	
25 ● 20 gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg caa gcc gtc gcg tca			816
Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser			
260	265	270	
25 aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg tta agc cag cac cct			864
Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro			
275	280	285	
30 ● 30 gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act aag cgc atg agt aac			912
Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn			
290	295	300	
35 tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac cat cat gat cag ctc			960
Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu			
305	310	315	320
35 ● 40 gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac cgc gag ctg att gac			1008
Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp			
325	330	335	
40 ● 40 gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac ttc tca ctt tat ctg			1056
Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu			
340	345	350	
45 ● 45 cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg cct gaa ggt tgc ggc			1104
His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly			
355	360	365	
50 ● 50 agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta ggc acc gcg aac ctc			1152
Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu			
370	375	380	
50 gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac cgt att ttt gcg tac			1200
Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr			
385	390	395	400

ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cg <sup>g</sup> agt cag ctg gtc acg cac Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His 405	410	415	1248
5			
cg <sup>g</sup> atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag ctt aat gcc tat cat Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His 420	425	430	1296
10			
ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc cag agc gcc tgg ttt Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe 435	440	445	1344
15			
cg <sup>g</sup> ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat ctc tac ctg gtc ggc Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly 450	455	460	1392
20			
gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc gtc atc ggc tcg gca Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala 465	470	475	480
25			
aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg ata tga Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile 485	490		1479
30			
<210> 130			
<211> 492			
35			
<212> PRT			
<213> Erwinia uredovora			
40			
<400> 130			
Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu 1 5 10 15			
45			
Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln 20 25 30			
50			
Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe 35 40 45			
Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu 50 55 60			

175

Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
65 70 75 80

5 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
85 90 95

Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
10 100 105 110

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser  
115 120 125

15

Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe  
130 135 140

20

Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu  
145 150 155 160

25

Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp  
165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly  
30 180 185 190

Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu  
35 195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val  
210 215 220

40

Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu  
225 230 235 240

45 Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala  
245 250 255

Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser  
50 260 265 270

Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro  
275 280 285

Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn  
290 295 300

5

Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu  
305 310 315 320

10

Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp  
325 330 335

15 Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu  
340 345 350

20 His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly  
355 360 365

.Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu  
370 375 380

25

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr  
385. 390 395 400

30

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His  
405 410 415

35

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
420 425 430

40

Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe  
435 440 445

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
450 455 460

45

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
465 470 475 480

50

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
485 490

<210> 131  
 <211> 1725  
 5 <212> DNA  
 <213> Narcissus pseudonarcissus

10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (1)...(1725)  
 <223>

20 <400> 131  
 atg gct tct tcc act tgt tta att cat tct tcc tct ttt ggg gtt gga 48  
 Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
 1 5 10 15

25 gga aag aaa gtg aag aac acg atg att cga tcg aag ttg ttt tca 96  
 Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
 20 25 30

30 att cgg tcg gct ttg gac act aag gtg tct gat atg agc gtc aat gct 144  
 Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
 35 40 45

35 cca aaa gga ttg ttt cca cca gag cct gag cac tac agg ggg cca aag 192  
 Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
 50 55 60

40 ctt aaa gtg gct atc att gga gct ggg ctc gct ggc atg tca act gca 240  
 Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
 65 70 75 80

45 gtg gag ctt ttg gat caa ggg cat gag gtt gac ata tat gaa tcc aga 288  
 Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
 85 90 95

50 caa ttt att ggt ggt aaa gtc ggt tct ttt gta gat aag cgt gga aac 336  
 Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
 100 105 110

55 cat att gaa atg gga ctc cat gtg ttt ggt tgc tat aac aat ctt 384  
 His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
 115 120 125

60 ttc aga ctt atg aaa aag gta ggt gca gat gaa aat tta ctg gtg aag 432

	Phe Arg Leu Met Lys Lys Val Gly Ala Asp Glu Asn Leu Leu Val Lys		
	130	135	140
	gat cat act cat acc ttt gta aac cga ggt gga gaa att ggt gaa ctt		480
5	Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Arg Gly Gly Glu Ile Gly Glu Leu		
	145	150	155
	160		
	gat ttc cga ctt ccg atg ggt gca cca tta cat ggt att cgt gca ttt		528
	Asp Phe Arg Leu Pro Met Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Arg Ala Phe		
10	165	170	175
	cta aca act aat caa ctg aag cct tat gat aaa gca agg aat gct gtg		576
	Leu Thr Thr Asn Gln Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala Val		
	180	185	190
15	gct ctt gcc ctt agc cca gtt gta cgt gct ctt att gat cca aat ggt		624
	Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Ile Asp Pro Asn Gly		
	195	200	205
20	gca atg cag gat ata agg aac tta gat aat att agc ttt tct gat tgg		672
	Ala Met Gln Asp Ile Arg Asn Leu Asp Asn Ile Ser Phe Ser Asp Trp		
	210	215	220
25	ttc tta tcc aaa ggc ggt acc cgc atg agc atc caa agg atg tgg gat		720
	Phe Leu Ser Lys Gly Gly Thr Arg Met Ser Ile Gln Arg Met Trp Asp		
	225	230	235
	240		
	cca gtt gct tat gcc ctc gga ttt att gac tgt gat aat atc agt gcc		768
	Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser Ala		
30	245	250	255
	cgt tgt atg ctt act ata ttt tct cta ttt gct act aag aca gaa gct		816
	Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ser Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu Ala		
	260	265	270
35	tct ctg ttg cgt atg ttg aag ggt tcg cct gat gtt tac tta agc ggt		864
	Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser Gly		
	275	280	285
40	cct ata aga aag tat att aca gat aaa ggt gga agg ttt cac cta agg		912
	Pro Ile Arg Lys Tyr Ile Thr Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Leu Arg		
	290	295	300
45	tgg ggg tgt aga gag ata ctt tat gat gaa cta tca aat ggc gac aca		960
	Trp Gly Cys Arg Glu Ile Leu Tyr Asp Glu Leu Ser Asn Gly Asp Thr		
	305	310	315
	320		
	tat atc aca ggc att gca atg tcg aag gct acc aat aaa aaa ctt gtg		1008
	Tyr Ile Thr Gly Ile Ala Met Ser Lys Ala Thr Asn Lys Lys Leu Val		
50	325	330	335
	aaa gct gac gtg tat gtt gca gca tgt gat gtt cct gga ata aaa agg		1056
	Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg		
	340	345	350

	ttg atc cca tcg gag tgg aga gaa tgg gat cta ttt gac aat atc tat Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr 355	360	365	1104
5	aaa cta gtt gga gtt cca gtt gtc act gtt cag ctt agg tac aat ggt Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly 370	375	380	1152
10	tgg gtg aca gag atg caa gat ctg gaa aaa tca agg cag ttg aga gct Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala 385	390	395	400
15	gca gta gga ttg gat aat ctt ctt tat act cca gat gca gac ttt tct Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser 405	410	415	1248
20	tgt ttt tct gat ctt gca ctc tcg tcg cct gaa gat tat tat att gaa Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu 420	425	430	1296
25	gga caa ggg tcc cta ata cag gct gtt ctc acg cca ggg gat cca tac Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr 435	440	445	1344
30	atg ccc cta cct aat gat gca att ata gaa aga gtt cg <sup>g</sup> aaa cag gtt Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val 450	455	460	1392
35	ttg gat tta ttc cca tcc tct caa ggc ctg gaa gtt cta tgg tct tcg Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser 465	470	475	480
40	gtg gtt aaa atc gga caa tcc cta tat cg <sup>g</sup> gag ggg cct gga aag gac Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp 485	490	495	1488
45	cca ttc aga cct gat cag aag aca cca gta aaa aat ttc ttc ctt gca Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala 500	505	510	1536
50	ggt tca tac acc aaa cag gat tac att gac agt atg gaa gga gcg acc Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr 515	520	525	1584
55	cta tcg ggg aga caa gca gct gca tat atc tgc agc gcc ggt gaa gat Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp 530	535	540	1632
60	ctg gca gca ctt cgc aag aag atc gct gct gat cat cca gag caa ctg Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu 545	550	555	560
65	atc aac aaa gat tct aac gtg tcg gat gaa ctg agt ctc gta taa			1725

PF 54148

180

Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
565 570

5 <210> 132  
<211> 574  
<212> PRT  
10 <213> Narcissus pseudonarcissus

15 <400> 132  
Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
1 5 10 15

20 Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
20 25 30

25 Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
35 40 45

30 Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
50 55 60

35 Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
65 70 75 80

Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
85 90 95

40 Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
100 105 110

45 His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
115 120 125

50 Phe Arg Leu Met Lys Lys Val Gly Ala Asp Glu Asn Leu Leu Val Lys  
130 135 140

Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Arg Gly Gly Glu Ile Gly Glu Leu  
145 150 155 160

Asp Phe Arg Leu Pro Met Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Arg Ala Phe  
165 170 175

5

Leu Thr Thr Asn Gln Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala Val  
180 185 190

10

Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Ile Asp Pro Asn Gly  
195 200 205

15 Ala Met Gln Asp Ile Arg Asn Leu Asp Asn Ile Ser Phe Ser Asp Trp  
210 215 220

20 Phe Leu Ser Lys Gly Gly Thr Arg Met Ser Ile Gln Arg Met Trp Asp  
225 230 235 240

25 Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser Ala  
245 250 255

25

Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ser Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu Ala  
260 265 270

30

Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser Gly  
275 280 285

35

Pro Ile Arg Lys Tyr Ile Thr Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Leu Arg  
290 295 300

40

Trp Gly Cys Arg Glu Ile Leu Tyr Asp Glu Leu Ser Asn Gly Asp Thr  
305 310 315 320

Tyr Ile Thr Gly Ile Ala Met Ser Lys Ala Thr Asn Lys Lys Leu Val  
325 330 335

45

Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg  
340 345 350

50

Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr  
355 360 365

182

Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly  
 370 375 380

5 Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala  
 385 390 395 400

10 Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser  
 405 410 415

Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu  
 420 425 430

15 Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr  
 435 440 445

20 Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val  
 450 455 460

25 Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser  
 465 470 475 480

30 Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp  
 485 490 495

Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala  
 500 505 510

35 Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr  
 515 520 525

40 Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
 530 535 540

45 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
 545 550 555 560

50 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

&lt;211&gt; 1848

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1848)

15 &lt;223&gt;

20	<400> 133 atg tgt acc ttg agt ttt atg tat cct aat tca ctt ctt gat ggt acc Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr 1                       5                       10                       15	48
25	tgc aag act gta gct ttg ggt gat agc aaa cca aga tac aat aaa cag Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln 20                       25                       30	96
30	aga agt tct tgt ttt gac cct ttg ata att gga aat tgt act gat cag Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln 35                       40                       45	144
35	cag cag ctt tgt ggc ttg agt tgg ggg gtg gac aag gct aag gga aga Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg 50                       55                       60	192
40	aga ggg ggt act gtt tcc aat ttg aaa gca gtt gta gat gta gac aaa Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys 65                       70                       75                       80	240
45	aga gtg gag agc tat ggc agt agt gat gta gaa gga aat gag agt ggc Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly 85                       90                       95	288
50	agc tat gat gcc att gtt ata ggt tca gga ata ggt gga ttg gtg gca Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala 100                      105                       110	336
55	gcg acg cag ctg gcg gtt aag gga gct aag gtt tta gtt ctg gag aag Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys 115                      120                       125	384
60	tat gtt att cct ggt gga agc tct ggc ttt tac gag agg gat ggt tat Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr 130                      135                       140	432

aag ttt gat gtt ggt tca tca gtg atg ttt gga ttc agt gat aag gga Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly 145	150	155	160	480
5 aac ctc aat tta att actcaa gca ttg gca gca gta gga cgt aaa tta Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Val Gly Arg Lys Leu 165	170	175		528
10 gaa gtt ata cct gac cca aca act gta cat ttc cac ctg cca aat gac Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp 180	185	190		576
15 ctt tct gtt cgt ata cac cga gag tat gat gac ttc att gaa gag ctt Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu 195	200	205		624
20 gtg agt aaa ttt cca cat gaa aag gaa ggg att atc aaa ttt tac agt Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser 210	215	220		672
25 gaa tgc tgg aag atc ttt aat tct ctg aat tca ttg gaa ctg aag tct Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser 225	230	235	240	720
30 ttg gag gaa ccc atc tac ctt ttt ggc cag ttc ttt aag aag ccc ctt Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu 245	250	255		768
35 gaa tgc ttg act ctt gcc tac tat ttg ccc cag aat gct ggt agc atc Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile 260	265	270		816
40 gag tgc tat ata aga gat cct ggg ttg ctg tct ttt ata gat gca Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile 275	280	285		864
45 aat gca agc atg gtt cta tgt gac aga cat ttt ggc gga atc aac tac Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr 305	310	315	320	912
50 ccc gtt ggt gga gtt ggc gag atc gcc aaa tcc tta gca aaa ggc ttg Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu 325	330	335		1008
55 gat gat cac gga agt cag ata ctt tat agg gca aat gtt aca agt atc Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile 340	345	350		1056
60 att ttg gac aat ggc aaa gct gtg gga gtg aag ctt tct gac ggg agg				1104

185

	Ile Leu Asp Asn Gly Lys Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg		
	355	360	365
	aag ttt tat gct aaa acc ata gta tcg aat gct acc aga tgg gat act		1152
5	Lys Phe Tyr Ala Lys Thr Ile Val Ser Asn Ala Thr Arg Trp Asp Thr		
	370	375	380
	ttt gga aag ctt tta aaa gct gag aat ctg cca aaa gaa gaa gaa aat		1200
	Phe Gly Lys Leu Leu Lys Ala Glu Asn Leu Pro Lys Glu Glu Glu Asn		
10	385	390	395
	ttc cag aaa gct tat gta aaa gca cct tct ttt ctt tct att cat atg		1248
	Phe Gln Lys Ala Tyr Val Lys Ala Pro Ser Phe Leu Ser Ile His Met		
	405	410	415
15	gga gtt aaa gca gat gta ctc cca cca gac aca gat tgt cac cat ttt		1296
	Gly Val Lys Ala Asp Val Leu Pro Pro Asp Thr Asp Cys His His Phe		
	420	425	430
20	gtc ctc gag gat gat tgg aca aat ttg gag aaa cca tat gga agt ata		1344
	Val Leu Glu Asp Asp Trp Thr Asn Leu Glu Lys Pro Tyr Gly Ser Ile		
	435	440	445
25	ttc ttg agt att cca aca gtt ctt gat tcc tca ttg gcc cca gaa gga		1392
	Phe Leu Ser Ile Pro Thr Val Leu Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly		
	450	455	460
	cac cat att ctt cac att ttt aca aca tcg agc att gaa gat tgg gag		1440
	His His Ile Leu His Ile Phe Thr Thr Ser Ser Ile Glu Asp Trp Glu		
30	465	470	475
	480		
	gga ctc tct ccg aaa gac tat gaa gcg aag aaa gag gtt gtt gct gaa		1488
	Gly Leu Ser Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Lys Lys Glu Val Val Ala Glu		
	485	490	495
35	agg att ata agc aga ctt gaa aaa aca ctc ttc cca ggg ctt aag tca		1536
	Arg Ile Ile Ser Arg Leu Glu Lys Thr Leu Phe Pro Gly Leu Lys Ser		
	500	505	510
40	tct att ctc ttt aag gag gtg gga act cca aag acc cac aga cga tac		1584
	Ser Ile Leu Phe Lys Glu Val Gly Thr Pro Lys Thr His Arg Arg Tyr		
	515	520	525
45	ctt gct cgt gat agt ggt acc tat gga cca atg cca cgc gga aca cct		1632
	Leu Ala Arg Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Pro Met Pro Arg Gly Thr Pro		
	530	535	540
	aag gga ctc ctg gga atg cct ttc aat acc act gct ata gat ggt cta		1680
	Lys Gly Leu Leu Gly Met Pro Phe Asn Thr Thr Ala Ile Asp Gly Leu		
50	545	550	555
	560		
	tat tgt gtt ggc gat agt tgc ttc cca gga caa ggt gtt ata gct gta		1728
	Tyr Cys Val Gly Asp Ser Cys Phe Pro Gly Gln Gly Val Ile Ala Val		
	565	570	575

gcc ttt tca gga gta atg tgc gct cat cgt gtt gca gct gac tta ggg Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly 580 585 590	1776
5	
ttt gaa aaa aaa tca gat gtg ctg gac agt gct ctt ctt aga cta ctt Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu 595 600 605	1824
10 ggt tgg tta agg aca cta gca tga Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala 610 615	1848
15 <210> 134	
<211> 615	
20 <212> PRT	
20 <213> Lycopersicon esculentum	
25 <400> 134	
Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr 1 5 10 15	
30 Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln 20 25 30	
35 Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln 35 40 45	
40 Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg 50 55 60	
45 Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys 65 70 75 80	
Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly 85 90 95	
50 Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala 100 105 110	

187

Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys  
115 120 125

5 Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr  
130 135 140

Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly  
10 145 150 155 160

Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu  
165 170 175

15 Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp  
180 185 190

Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu  
20 195 200 205

25 Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser  
210 215 220

Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser  
30 225 230 235 240

Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu  
245 250 255

35 Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile  
260 265 270

40 Ala Arg Lys Tyr Ile Arg Asp Pro Gly Leu Leu Ser Phe Ile Asp Ala  
275 280 285

45 Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile  
290 295 300

Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr  
50 305 310 315 320

Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu  
325 330 335

Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile  
340 345 350

5

Ile Leu Asp Asn Gly Lys Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg  
355 360 365

10

Lys Phe Tyr Ala Lys Thr Ile Val Ser Asn Ala Thr Arg Trp Asp Thr  
370 375 380

15

Phe Gly Lys Leu Leu Lys Ala Glu Asn Leu Pro Lys Glu Glu Glu Asn  
385 390 395 400

20

Phe Gln Lys Ala Tyr Val Lys Ala Pro Ser Phe Leu Ser Ile His Met  
405 410 415

Gly Val Lys Ala Asp Val Leu Pro Pro Asp Thr Asp Cys His His Phe  
420 425 430

25

Val Leu Glu Asp Asp Trp Thr Asn Leu Glu Lys Pro Tyr Gly Ser Ile  
435 440 445

30

Phe Leu Ser Ile Pro Thr Val Leu Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly  
450 455 460

35

His His Ile Leu His Ile Phe Thr Thr Ser Ser Ile Glu Asp Trp Glu  
465 470 475 480

40

Gly Leu Ser Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Lys Lys Glu Val Val Ala Glu  
485 490 495

45

Arg Ile Ile Ser Arg Leu Glu Lys Thr Leu Phe Pro Gly Leu Lys Ser  
500 505 510

Ser Ile Leu Phe Lys Glu Val Gly Thr Pro Lys Thr His Arg Arg Tyr  
515 520 525

50

Leu Ala Arg Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Pro Met Pro Arg Gly Thr Pro  
530 535 540

## PF 54148

189

Lys Gly Leu Leu Gly Met Pro Phe Asn Thr Thr Ala Ile Asp Gly Leu  
 545 550 555 560

5 Tyr Cys Val Gly Asp Ser Cys Phe Pro Gly Gln Gly Val Ile Ala Val  
 565 570 575

10 Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly  
 580 585 590

15 Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu  
 595 600 605

Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala  
 610 615

20 <210> 135

<211> 1233

25 <212> DNA

<213> Tagetes erecta

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(1233)

<223>

40 <400> 135

atg gcc aca cac aaa ctc ctt caa ttc acc acc aat ctc cca cca tct  
 Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

45 tct tct tca atc tct act ggc tgt tca ctc tcc ccc ttc ttc ctc aaa  
 Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
 20 25 30

50 tca tct tct cat tcc cct aac cct cgc cga cac cgc cgc tcc gcc gta  
 Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val  
 35 40 45

tgc tgc tct ttc gcc tca ctc gac tct gca aaa atc aaa gtc gtt ggc 192

## 190

	Cys Cys Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Ala Lys Ile Lys Val Val Gly				
	50	55	60		
5	gtc ggt ggt ggc aac aat gcc gtt aac cgc atg att ggt agc ggc			240	
	Val Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly				
	65	70	75	80	
10	tta cag ggt gtt gat ttt tac gcc att aac acg gac tca caa gcg ctt			288	
	Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu				
	85	90	95		
15	ctg caa tct gtt gca cat aac cct att caa att ggg gag ctt ttg act			336	
	Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr				
	100	105	110		
	cgt gga tta ggt act ggt ggg aac ccg ctt ttg gga gaa cag gct gcg			384	
	Arg Gly Leu Gly Thr Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala				
	115	120	125		
20	gag gag tcg aag gaa gcg att ggg aat gcg ctt aaa ggg tcg gat ctt			432	
	Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu				
	130	135	140		
25	gtg ttt ata aca gca ggt atg ggt ggg acg ggt tcg ggt gct gct			480	
	Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala				
	145	150	155	160	
30	cca gtt gta gcg cag ata gcg aaa gaa gca ggg tat tta act gtt ggt			528	
	Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly				
	165	170	175		
	gtt gta acg tac cca ttc agc ttt gaa ggc cgt aaa aga tca gta cag			576	
	Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln				
	180	185	190		
35	gct tta gag gct att gag aag ctg caa aag aac gtt gac aca ctt ata			624	
	Ala Leu Glu Ala Ile Glu Lys Leu Gln Lys Asn Val Asp Thr Leu Ile				
	195	200	205		
40	gtg att cca aat gac cgt ttg ctg gat att gct gat gaa aac acg cct			672	
	Val Ile Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asp Ile Ala Asp Glu Asn Thr Pro				
	210	215	220		
45	ctt cag gat gct ttt ctt gct gat gat gta ctc cgc caa gga gtt			720	
	Leu Gln Asp Ala Phe Leu Leu Ala Asp Asp Val Leu Arg Gln Gly Val				
	225	230	235	240	
50	caa gga atc tca gat ata att aca ata cct ggg ctg gta aat gtg gac			768	
	Gln Gly Ile Ser Asp Ile Ile Thr Ile Pro Gly Leu Val Asn Val Asp				
	245	250	255		
	ttt gca gac gtt aaa gca gtc atg aaa gat tct gga act gca atg ctt			816	
	Phe Ala Asp Val Lys Ala Val Met Lys Asp Ser Gly Thr Ala Met Leu				
	260	265	270		

ggt gtc ggt gtt tcc tca agt aaa aac cga gct gaa gaa gca gct gaa Gly Val Gly Val Ser Ser Ser Lys Asn Arg Ala Glu Glu Ala Ala Glu 275 280 285	864
5 caa gca act ctt gct cct ttg att gga tca tca att caa tct gct aca Gln Ala Thr Leu Ala Pro Leu Ile Gly Ser Ser Ile Gln Ser Ala Thr 290 295 300	912
10 ggt gtt gtt tat aat att acc gga ggg aag gac ata act cta caa gaa Gly Val Val Tyr Asn Ile Thr Gly Gly Lys Asp Ile Thr Leu Gln Glu 305 310 315 320	960
15 gtc aac agg gtt tct cag gtg gta aca agt ttg gca gat cca tca gca Val Asn Arg Val Ser Gln Val Val Thr Ser Leu Ala Asp Pro Ser Ala 325 330 335	1008
20 aac att ata ttc ggg gca gtg gta gat gag aga tac aac ggg gag att Asn Ile Ile Phe Gly Ala Val Val Asp Glu Arg Tyr Asn Gly Glu Ile 340 345 350	1056
25 cat gtg acc att gtt gct act ggc ttt gcc cag tcg ttt cag aaa tct His Val Thr Ile Val Ala Thr Gly Phe Ala Gln Ser Phe Gln Lys Ser 355 360 365	1104
30 ctt ctt gct gac ccg aaa gga gca aaa ctt gtt gat aga aat caa gaa Leu Leu Ala Asp Pro Lys Gly Ala Lys Leu Val Asp Arg Asn Gln Glu 370 375 380	1152
35 cct aca caa cct ttg act tcc gcg aga tct ttg aca aca cct tct cct Pro Thr Gln Pro Leu Thr Ser Ala Arg Ser Leu Thr Thr Pro Ser Pro 385 390 395 400	1200
40 gct ccg tct cgg tct agg aaa ctc ttc ttt taa <210> 136 <211> 410 <212> PRT	1233
45 <213> Tagetes erecta	
40 <400> 136 50 Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser 1 5 10 15	

192

	Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys			
	20	25	30	
5	Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val			
	35	40	45	
10	Cys Cys Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Ala Lys Ile Lys Val Val Gly			
	50	55	60	
15	Val Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly			
	65	70	75	80
20	Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu			
	85	90	95	
25	Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr			
	100	105	110	
30	Arg Gly Leu Gly Thr Gly Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala			
	115	120	125	
35	Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu			
	130	135	140	
40	Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala			
	145	150	155	160
45	Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly			
	165	170	175	
50	Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Phe Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln			
	180	185	190	
55	Ala Leu Glu Ala Ile Glu Lys Leu Gln Lys Asn Val Asp Thr Leu Ile			
	195	200	205	
60	Val Ile Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asp Ile Ala Asp Glu Asn Thr Pro			
	210	215	220	
65	Leu Gln Asp Ala Phe Leu Leu Ala Asp Asp Val Leu Arg Gln Gly Val			
	225	230	235	240

Gln Gly Ile Ser Asp Ile Ile Thr Ile Pro Gly Leu Val Asn Val Asp  
245 250 255

5

Phe Ala Asp Val Lys Ala Val Met Lys Asp Ser Gly Thr Ala Met Leu  
260 265 270

10

Gly Val Gly Val Ser Ser Ser Lys Asn Arg Ala Glu Glu Ala Ala Glu  
275 280 285

15

Gln Ala Thr Leu Ala Pro Leu Ile Gly Ser Ser Ile Gln Ser Ala Thr  
290 295 300

20

Gly Val Val Tyr Asn Ile Thr Gly Gly Lys Asp Ile Thr Leu Gln Glu  
305 310 315 320

25

Val Asn Arg Val Ser Gln Val Val Thr Ser Leu Ala Asp Pro Ser Ala  
325 330 335

30

Asn Ile Ile Phe Gly Ala Val Val Asp Glu Arg Tyr Asn Gly Glu Ile  
340 345 350

35

His Val Thr Ile Val Ala Thr Gly Phe Ala Gln Ser Phe Gln Lys Ser  
355 360 365

40

Leu Leu Ala Asp Pro Lys Gly Ala Lys Leu Val Asp Arg Asn Gln Glu  
370 375 380

45

Pro Thr Gln Pro Leu Thr Ser Ala Arg Ser Leu Thr Thr Pro Ser Pro  
385 390 395 400

Ala Pro Ser Arg Ser Arg Lys Leu Phe Phe  
405 410

50

<210> 137  
<211> 891  
<212> DNA  
<213> Tagetes erecta

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(891)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 137

atg aca tcc ctg agg ttt cta aca gaa ccc tca ctt gta tgc tca tcc 48  
 15 Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser  
 1 5 10 15

act ttc ccc aca ttc aat ccc cta cac aaa acc cta act aaa cca aca 96  
 Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr  
 20 20 25 30

cca aaa ccc tac cca aag cca cca att cgc tcc gtc ctt caa tac 144  
 Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
 35 40 45

25 aat cgc aaa cca gag ctc gcc gga gac act cca cga gtc gtc gca atc 192  
 Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
 50 55 60

30 gac gcc gac gtt cta cgt aac ctc gat ctt ctt ctc ggt ctc gaa 240  
 Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
 65 70 75 80

35 aac cgc gtc aat tac acc gtc gtt gaa gtt ctc aac ggc gat tgc aga 288  
 Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
 85 90 95

40 ctc gac caa gcc cta gtt cgt gat aaa cgc tgg tca aat ttc gaa ttg 336  
 Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu  
 100 105 110

45 ctt tgt att tca aaa cct agg tca aaa ttg cct tta gga ttt ggg gga 384  
 Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly  
 115 120 125

50 aaa gct tta gtt tgg ctt gat gca tta aaa gat agg caa gaa ggt tgc 432  
 Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys  
 130 135 140

55 ccg gat ttt ata ctt ata gat tgt cct gca ggt att gat gcc ggg ttc 480  
 Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe  
 145 150 155 160

ata acc gcc att aca ccg gct aac gaa gcc gta tta gtt aca aca cct 528

## 195

	Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro			
	165	170	175	
	gat att act gca ttg aga gat gca gat aga gtt aca ggc ttg ctt gaa			576
5	Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu			
	180	185	190	
	tgt gat gga att agg gat att aaa atg att gtg aac aga gtt aga act			624
	Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr			
10	195	200	205	
	gat ttg ata agg ggt gaa gat atg atg tca gtt ctt gat gtt caa gag			672
	Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu			
	210	215	220	
15	atg ttg gga ttg tca ttg ttg agt gat acc cga gga ttc gaa gtg att			720
	Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile			
	225	230	235	240
20	cggtt acg aat aga ggg ttt ccgtt gttt aac aag cct ccgtt act			768
	Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr			
	245	250	255	
25	tta gca gga ttg gca ttt gag cag gct gct tgg aga ttg gtt gag caa			816
	Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln			
	260	265	270	
30	gat agc atg aag gct gtg atg gtg gag gaa gaa cct aaa aag agg gga			864
	Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly			
	275	280	285	
	ttt ttc tcg ttt ttt gga ggt tag tga			891
	Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly			
	290	295		
35	<210> 138			
	<211> 295			
40	<212> PRT			
	<213> Tagetes erecta			
45	<400> 138			
	Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser			
50	1	5	10	15
	Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr			
	20	25	30	

Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
35 40 45

5

Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
50 55 60

10

Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
65 70 75 80

15

Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
85 90 95

20

Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu  
100 105 110

25

Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly  
115 120 125

Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys  
130 135 140

30

Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe  
145 150 155 160

35

Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro  
165 170 175

40

Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu  
180 185 190

45

Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr  
195 200 205

50

Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu  
210 215 220

Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile  
225 230 235 240

197

Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr	
245	250
	255

5 Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln	
260	265
	270

10 Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly	
275	280
	285

Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly	
290	295

15

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 332

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30

&lt;222&gt; (1)...(330)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 139

aag ctt gca cga gcc tct ctc tat ttt tac act tca atg gcg gca gca	48
Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala	
40 1 5 10 . 15	

att gct gtc cct tgt agc tca aga cca ttt ggc tta ggt cga atg cgg	96
Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg	
20 25 30	

45

tta ctt ggt cat aaa ccc aca acc ata act tgt cac ttc ccc ttt tct	144
Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser	
35 40 45	

50 ttt tct atc aaa tca ttt acc cca att gtt agg ggc aga aga tgt act	192
Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr	
50 55 60	

gtt tgt ttt gtt gcc ggt ggc gac agt aat agt aac agt aat aat aat	240
---	-----

198

Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

agt gac agt aat agt aat ccg ggt ctg gat tta aac ccg gcg gtt 288  
 5 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
 85 90 95

atg aac cgt aac cgt ttg gtt gaa gaa aaa atg gag agg tcg ac 332  
 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
 10 100 105 110

<210> 140

15 <211> 110

<212> PRT

20 <213> Tagetes erecta

<400> 140

25 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

30 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
 20 25 30

Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
 35 40 45

35 Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
 50 55 60

40 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

45 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
 85 90 95

50 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
 100 105 110

<210> 141

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

10

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(332)

15 &lt;223&gt; b-Hydroxylase Sense-Fragment

&lt;400&gt; 141

20 aagcttgcac gagcctctct ctattttac acttcaatgg cggcagcaat tgctgtccct 60

tgtagctcaa gaccatttgg cttaggtcga atgcggttac ttggtcataa acccacaacc 120

ataacttgtc acttccccctt ttcttttct atcaaatcat ttaccccaat tgtaggggc 180

25 agaagatgta ctgtttgtt tggccgggt ggcgacagta atagtaacag taataataat 240

agtgacagta atagtaataa tccgggtctg gatttaaacc cggcggttat gaaccgtaac 300

30 cgtttggttg aagaaaaaat ggagaggctcg ac 332

&lt;210&gt; 142

35 &lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

40

&lt;220&gt;

45 &lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(332)

&lt;223&gt; b-Hydroxylase Antisense-Fragment

50

&lt;400&gt; 142

gaattcggca cgagcctctc tctatTTTA cacttcaatg gcggcagcaa ttgctgtccc 60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**